

307/12

**Zur Eignung einer verschärften Alkoholprobe
als ein Verfahren zur Bestimmung der
mikrobiologischen Beschaffenheit von Rohmilch**

Franz Jordans

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553812_0011

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan

Zur Eignung einer verschärften Alkoholprobe
als ein Verfahren zur Bestimmung der mikro-
biologischen Beschaffenheit von Rohmilch

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München



von
Franz Jordans
aus
Marienbaum

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan:	Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent:	Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent:	Prof. Dr. K. Walser

Tag der Promotion: 30. Juli 1976



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Grundlagen	2
3.	Methoden	3
4.	Ergebnisse	4
5.	Diskussion	5
6.	Fazit	6
7.	Literaturverzeichnis	7
8.	Anhang	8
9.	Bibliographie	9
10.	Index	10
11.	Abkürzungen	11
12.	Formeln	12
13.	Diagramme	13
14.	Tabelle	14
15.	Formeln	15
16.	Diagramme	16
17.	Tabelle	17
18.	Formeln	18
19.	Diagramme	19
20.	Tabelle	20
21.	Formeln	21
22.	Diagramme	22
23.	Tabelle	23
24.	Formeln	24
25.	Diagramme	25
26.	Tabelle	26
27.	Formeln	27
28.	Diagramme	28
29.	Tabelle	29
30.	Formeln	30
31.	Diagramme	31
32.	Tabelle	32
33.	Formeln	33
34.	Diagramme	34
35.	Tabelle	35
36.	Formeln	36
37.	Diagramme	37
38.	Tabelle	38
39.	Formeln	39
40.	Diagramme	40
41.	Tabelle	41
42.	Formeln	42
43.	Diagramme	43
44.	Tabelle	44
45.	Formeln	45
46.	Diagramme	46
47.	Tabelle	47
48.	Formeln	48
49.	Diagramme	49
50.	Tabelle	50
51.	Formeln	51
52.	Diagramme	52
53.	Tabelle	53
54.	Formeln	54
55.	Diagramme	55
56.	Tabelle	56
57.	Formeln	57
58.	Diagramme	58
59.	Tabelle	59
60.	Formeln	60
61.	Diagramme	61
62.	Tabelle	62
63.	Formeln	63
64.	Diagramme	64
65.	Tabelle	65
66.	Formeln	66
67.	Diagramme	67
68.	Tabelle	68
69.	Formeln	69
70.	Diagramme	70
71.	Tabelle	71
72.	Formeln	72
73.	Diagramme	73
74.	Tabelle	74
75.	Formeln	75
76.	Diagramme	76
77.	Tabelle	77
78.	Formeln	78
79.	Diagramme	79
80.	Tabelle	80
81.	Formeln	81
82.	Diagramme	82
83.	Tabelle	83
84.	Formeln	84
85.	Diagramme	85
86.	Tabelle	86
87.	Formeln	87
88.	Diagramme	88
89.	Tabelle	89
90.	Formeln	90
91.	Diagramme	91
92.	Tabelle	92
93.	Formeln	93
94.	Diagramme	94
95.	Tabelle	95
96.	Formeln	96
97.	Diagramme	97
98.	Tabelle	98
99.	Formeln	99
100.	Diagramme	100

Meinen Eltern in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	3
2.1. Alkoholstabilität der Milch	3
2.1.1. Allgemeines	3
2.1.2. Einfluß verschiedener Faktoren auf die Alkoholstabilität	8
2.1.3. Prüfung der Alkoholstabilität mit Alkohol verschiedener Konzentrationen	11
2.1.4. Beziehungen zwischen Alkoholstabilität und Keimgehalt	14
2.1.5. Bedeutung der Alkoholstabilität als Parameter der hygienischen Qualität von Rohmilch	18
2.2. Verfahren zur Bestimmung der mikrobiologischen Beschaffenheit von Rohmilch	24
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	29
3.1. Material	29
3.2. Methodik	30
3.2.1. Alkoholstabilität	30
3.2.2. Gesamtkeimzahl	31
3.2.3. Pyruvat- und L(+)-Laktatgehalt	32
3.2.4. Psychrotrophe Keime	32
3.2.5. Coliforme Keime	32
3.2.5.1. Standard-Routinemethode	33
3.2.5.2. Stempelverfahren	33
3.2.6. Statistische Auswertung	36
3.3. Ergebnisse	37
3.3.1. Alkoholstabilität	37

	Seite
3.3.2. Gesamtkeimzahl	41
3.3.3. Pyruvat- und L(+)-Laktatgehalt	45
3.3.4. Psychrotrophe Keime	48
3.3.5. Coliforme Keime	50
3.3.5.1. Standard-Routinemethode	50
3.3.5.2. Stempelverfahren	51
3.3.6. Beziehungen zwischen Alkoholstabilität und den anderen geprüften Parametern	54
4. DISKUSSION	78
5. Zusammenfassung - Summary	88
6. LITERATURVERZEICHNIS	94

1. EINLEITUNG

In den meisten Ländern der Bundesrepublik wird immer noch die Reduktionsprobe im Rahmen der Gütebewertung zur Beurteilung der hygienischen Qualität der Rohmilch herangezogen. Zwar bieten Reduktionsproben den Vorteil einer leichten Handhabung auch bei Massenuntersuchungen, doch ist zu berücksichtigen, daß sie insbesondere bei tiefgekühlter Milch nur bedingt aussagekräftig sind. Zuverlässige Aussagen über die mikrobiologische Qualität der Rohmilch sind bisher nur mit kulturellen Keimgehaltsbestimmungen möglich. In den letzten Jahren wurde auch die Eignung von mikrobiellen Stoffwechselprodukten, wie Pyruvat oder Laktat, als Parameter für die hygienische Wertigkeit von Rohmilch diskutiert, ohne daß eine endgültige Bewertung schon erfolgen kann.

Der Einfluß mikrobieller Aktivität auf die Milch kann auch mit der Alkoholprobe erfaßt werden, die darauf beruht, daß die Fällbarkeit der Proteine durch Alkohol mit fortschreitendem Stoffwechsel der Mikroorganismen zunimmt. Dieses seit langem angewandte Verfahren dient der Ermittlung verdorbener Milch (Probe mit 68 Vol.-%) oder zur Prüfung besonderer Anforderungen, z.B. an Vorzugsmilch und Sterilmilch (doppelte Alkoholprobe).

Aufgabe dieser Arbeit war es, in einem kleinen Molkereieinzugsbereich über längere Zeit zu prüfen, ob und inwieweit mit einer abgestuften Probe mit höheren Alkoholkonzentrationen die hygienische Beschaffenheit der Anlieferungsmilch beurteilt werden kann. Vergleichsweise sollte die Ge-

samtkeimzahl sowie die Anzahl psychrotropher bzw. coliformer Mikroorganismen ermittelt werden. In orientierenden Untersuchungen sollten auch die elektronische Mikrokoloniezählung sowie die Pyruvat- und L(+)-Laktatbestimmung verglichen werden.

2. L I T E R A T U R

2.1. Alkoholstabilität der Milch

2.1.1. Allgemeines

Kolloide, wie die Eiweißstoffe der Milch, können in gequollenem Zustand im allgemeinen durch Zusatz von Methylalkohol oder Äthylalkohol zum Ausflocken gebracht werden. "Und zwar ist dies" - wie ROEDER (1954) schreibt - "grob so zu erklären, daß den Kolloiden durch den Alkohol Quellwasser entzogen wird, wodurch sie von dem Sol-Zustand in den Gel-Zustand übergehen. Diese Dehydratation ist naturgemäß abhängig vom Quellungszustand der Kolloide einerseits und von der Alkoholkonzentration andererseits. Bei genügend hoher Alkoholkonzentration wird sie immer erfolgen; hält man dagegen die Alkoholkonzentration niedriger, so tritt die Dehydratation um so leichter ein je schwächer die Kolloide an sich hydratisiert sind, bzw. je mehr eine anfänglich weitgehende Hydratation infolge irgendwelcher andersweitiger Ursachen zurückgegangen ist. Die mehr oder weniger große Neigung, durch Alkohol ausgeflockt zu werden, wird als "Alkoholempfindlichkeit" bezeichnet".

Auf dem Gebiet der Milchwirtschaft wurde dieses Prinzip der "Alkoholempfindlichkeit" bzw. "Alkoholstabilität" in Form der sogenannten Alkoholprobe bereits seit der Jahrhundertwende herangezogen, um Haltbarkeit bzw. Frischezustand der Milch zu prüfen. Zum ersten Male wurde die klassische Alkoholprobe mit 68 Vol.-%igem Alkohol im deutschen Schrifttum 1891 von MARTINY erwähnt (FLEISCHMANN, 1901; REISS, 1906; HENKEL, 1907; AUZINGER, 1909). Es ließ sich jedoch trotz umfangreicher Nachforschungen nicht feststellen, wo und von wem die Alkoholprobe eingeführt wurde. HENKEL (1907) vermutete, daß sie ursprünglich aus Dänemark stammt. AUZINGER

(1909) hielt es für möglich, daß der unbekannte Erfinder der klassischen Alkoholprobe durch die Beobachtung von EUGLING (1885) - "bei Versetzen frisch gemolkener Milch mit gleichem Volumen 95 %igen Alkohols tritt nach einigem energischen Rühren und Schütteln ein zusammenhängender Niederschlag von Käse auf" - dazu angeregt wurde, die Alkoholreaktion mit gleichen Volumina Milch und Alkohol niedrigerer Konzentration zu studieren. Die Alkoholprobe besteht darin, daß Milch und Alkohol von 68 Vol.-% zu gleichen Teilen gemischt werden und dann beobachtet wird, ob eine Gerinnung erfolgt. Anfänglich wurde die Alkoholprobe mit 15 ml Milch bzw. 15 ml Alkohol vorgenommen (MARTINY, 1891) oder auch mit jeweils 10 ml (REISS, 1906; GROSSE-BOHLE, 1907; AUZINGER, 1909; u.a.); allgemein durchgesetzt hat sich jedoch die Probe mit 2 ml Milch bzw. Alkohol (MORRES, 1905 und 1909; HENKEL, 1907; u.a.). Die Mikro-Alkoholprobe mit einem Tropfen Milch bzw. Alkohol (ASSENOWA, 1949) hat keine Bedeutung gewonnen.

Insbesondere MORRES, HENKEL sowie AUZINGER haben durch umfangreiche Untersuchungen dazu beigetragen, die Bedeutung verschiedener Faktoren für den Ausfall der Alkoholprobe zu klären. So zeigte sich, daß denaturierter Alkohol, dem aus ökonomischen Gründen häufig der Vorzug gegeben wurde (REISS, 1904; HENKEL, 1907), offensichtlich nicht immer für die Alkoholprobe geeignet ist, da einige Denaturierungsmittel bei Verdünnung des Alkohols mit Wasser auf 68 Vol.-% unlöslich werden, den Alkohol stark trüben und bei Durchführung der Alkoholprobe eine Gerinnung der Milch vortäuschen können (MORRES, 1905 und 1909). Einige Denaturierungsmittel schwächen auch die Wirkung des Alkohols auf die Milch wesentlich ab (MORRES, 1905; HENKEL, 1907). MORRES (1909) beschrieb z.B., daß ein denaturierter Alkohol um 4 Vol.-%

stärker - also auf 72 Vol.-% - eingestellt werden mußte als der zusatzfreie Alkohol. Außerdem muß der Alkohol säurefrei sein und neutral reagieren (REISS, 1904; GROSSE-BOHLE, 1907).

Ein Zusatz von Indikatorfarbstoffen zum Alkohol zwecks Verdeutlichung des Reaktionsausfalls scheint nicht unproblematisch zu sein. Die von REIMANN empfohlene Kombination von Alkoholprobe mit der Lackmusreaktion brachte manche Nachteile mit sich (MORRES, 1905). Lackmus beeinträchtigte die Wirkung des Alkohols ganz erheblich, da die Gerinnung der Milch erst bei viel höheren Säuregraden erfolgte als mit lackmusfreiem Alkohol gleicher Konzentration. Außerdem waren Alkohol-Lackmus-Mischungen nicht stabil. Mit der von MORRES (1909) erarbeiteten Kombination Alkoholprobe und Alizarin wurden diese Nachteile wie auch andere die Verwendung von Lackmus einschränkende Faktoren (schlechte Löslichkeit von Lackmus, geringe Farbabstufung bei positiven Proben, erst bei ca. 10^0 SH auftretender Farbumschlag) überwunden. Dieser auch Alizarolprobe genannten Kombination (MORRES, 1911) wurde von MORRES der Vorzug gegenüber der reinen Alkoholprobe gegeben, da mit ihr nicht nur der allgemeine Grad der Zersetzung angezeigt würde, sondern aufgrund der Ermittlung des ungefähren Säuregrades auch die besondere Art der Zersetzung - "saure" oder "süsse" Gerinnung (MORRES, 1909) bzw. "Milchsäuregärung, Labgärung oder gemischte Gärung" (MORRES, 1911) - und darüber hinaus Milch von euterkranken Kühen sowie "Natronzusatz" zu saurer Milch (MORRES, 1914). Auch wenn eine heftige Diskussion über die Bedeutung der Alizarolprobe einsetzte, und sie anfänglich unter anderem als "Probe ohne Wert" (ERNST, 1913) bzw. "hinsichtlich der Erken-

nung der Zersetzung als auf unrichtigen Voraussetzungen beruhend" (DEVARDA, 1914) bezeichnet wurde, hat sie sich später in Deutschland doch neben der Alkoholprobe behaupten können, vermutlich auch, weil TILLMANS und OBERMEIER (1920) die Abhängigkeit der Verfärbung bei der Alizarolprobe von der Wasserstoffionenkonzentration nachweisen konnten. So ist einer Übersicht von SOLTERBECK (1966) zu entnehmen, daß die Alizarolprobe seinerzeit noch im Rahmen der Güteprüfungen der Anlieferungsmilch in einigen Bundesländern (Bayern und Baden-Württemberg; Rheinland-Pfalz und Hamburg alternativ zur Alkoholprobe) vorgeschrieben war. Die von anderen Autoren verwendeten Indikatoren, z.B. Methylrot (CHALMERS, 1928; HIGGINBOTTOM, 1948) oder Bromkresolpurpur (CHALMERS, 1928; HIGGINBOTTOM, 1948; HUGHES und ELLISON, 1949; JONES-EVANS, 1949; MATTICK et al., 1950), haben sich nicht durchsetzen können. HIGGINBOTTOM (1948) fand unter anderem, daß nur 66 % aller positiven Proben bei reinem 68 Vol.-%igem Alkohol und Bromkresolpurpur (BKP)-haltigem Alkohol gleicher Konzentration reagierten, 28 % nur bei dem BKP-haltigen Alkohol und 6 % nur bei reinem Alkohol.

MORRES (1905) wies auch auf die Bedeutung der Alkoholkonzentration bei der klassischen Alkoholprobe hin. Die Konzentration (68 %) muß nach Volumen und nicht nach Gewicht eingestellt werden, da z.B. ein Alkohol von 68 Gewichtsprozenten einem solchen von 75 Volumenprozenten entspricht. Die Temperatur der Milch ist nach HENKEL (1907), soweit Wärmegrade bis 40° C in Betracht kommen, ohne Einfluß auf die Gerinnung, so daß sie für die Verhältnisse der Molkereipraxis nicht besonders berücksichtigt werden muß. Üblicher-

weise wird die Alkoholprobe jedoch mit Milch von 15 bis 25° C (ROEDER, 1954; HEINTZBERGER, 1958) durchgeführt. In kalter Milch kann nach Ansicht von LOEHNIS (1914) eine vorzeitige Gerinnung infolge Fettausscheidung vorgetäuscht werden. Bedeutsamer für den Ausfall der Alkoholprobe dürfte die Art und Weise sein, wie Milch und Alkohol zusammengegeben werden (HENKEL, 1907; AUZINGER, 1909). Es sollte stets der Alkohol auf die Milch gegeben werden, da im umgekehrten Falle - insbesondere wenn die Milch langsam eingegossen wird - leicht eine teilweise Gerinnung an den Grenz-zonen der durch den leichteren Alkohol hindurchtretenden und zu Boden sinkenden kleineren Milchmengen eintreten kann, die dann nach späterem Vermischen unter Umständen ein positives Ergebnis vortäuschen kann. HENKEL (1907) konnte z.B. demonstrieren, daß bei Zugabe von Milch in Mengen von 0,1 bis 0,6 ml zu 2 ml 68 Vol.-%igen Alkohols stets eine durchgehend feinflockige Gerinnung zu beobachten war, und der Alkohol erst ab 0,7 ml Milch so verdünnt war, daß er nicht mehr gerinnend auf die frische Milch wirkte.

Verschiedene Untersucher widmeten sich auch der Frage, ob und inwieweit eine Beziehung zwischen Gerinnung der Milch bei Durchführung der Alkoholprobe und dem Säuregrad dieser Milch besteht. Im allgemeinen ging man davon aus, daß die klassische Alkoholprobe ab 8° SH (FLEISCHMANN, 1901; MORRES, 1905; ERNST, 1913; AUZINGER, 1914; u.a.) bzw. ab 8,5° SH (HENKEL, 1907 und 1920) positiv ausfällt. HENKEL stellte bei seinen Untersuchungen aber auch fest, daß in einzelnen Fällen Mischmilch mit niedrigerem bzw. höherem SH° (Extremwerte 7,4 - 9,6) gerann. Er wies daher darauf hin, daß die Alkoholprobe nicht als eine Säurebestimmungsmethode ange-

sehen werden dürfe und sah ihren Wert nicht nur in der Erkennung und Schätzung der Säuerung, sondern auch der Ermittlung anderer Veränderungen in der normalen Beschaffenheit der Milch, die der Säuregrad allein nicht anzeigt. Daher behielt die Alkoholprobe auch weiterhin ihre Bedeutung, wenn auch nicht - wie anfänglich - als Verfahren zur Bestimmung der Azidität (SOMMER und BINNEY, 1923). Zuvor hatte auch MORRES (1905) schon angedeutet, daß die Ergebnisse der Alkoholprobe und der Säuregradbestimmung manchmal miteinander im Widerspruch stünden, die Alkoholprobe aber stets eine bessere Auskunft über die Haltbarkeit erlaube als der Säuregrad. Diese Beobachtungen fand MORRES (1909, 1911 und 1914) dann eindeutig bestätigt, als er mit Hilfe der Alizarolprobe des öfteren zwar eine Gerinnung der Milch, nicht aber eine Verfärbung des bei $7,6^{\circ}$ SH umschlagenden Alizarins registrieren konnte.

2.1.2. Einfluß verschiedener Faktoren auf die Alkoholstabilität

HENKEL (1907), AUZINGER (1909 und 1914), sowie HÖYBERG (1911), die nicht nur Mischmilch-, sondern auch Einzelmilchproben untersuchten, machten bereits frühzeitig darauf aufmerksam, daß die Alkoholprobe durch viele milchbedingte Faktoren beeinflusst werden kann. Diese Autoren hatten nämlich bei der Prüfung von frischer Mischmilch mit 68 Vol.-%igem Alkohol keine (HENKEL, HÖYBERG) bzw. nur eine (AUZINGER) positive Probe gefunden, während frische Einzelmilchproben wiederholt positiv ausfielen. HENKEL (1907) registrierte derartige Fälle bei Testung von Kolostrum und Milch altemelker Kühe. AUZINGER (1909) stellte unabhängig von HENKEL umfangreiche Erhebungen an über den Ausfall der Alkoholprobe bei Kolostralmilch, Milch

frischmelker, altmelker, euterkranker und euterkrank gewesener Kühe, "anormaler" Milch (Sekretionsstörungen) und bei Milch von Kühen, die verkalbt hatten. Er prüfte ferner, ob Beziehungen zwischen Alkoholreaktion und Trommsdorff'scher Leukozytenprobe oder verschiedenen Fermentreaktionen (Reduktase, Katalase, Diastase) bestehen, und wie die Verhältnisse bei erhitzter, gelabter, abgestandener, gewässerter oder mit chemischen Substanzen versetzter Milch sind. Darüber hinaus untersuchte er, ob die Alkoholprobe Schwankungen in Abhängigkeit von Melkzeit und Art des Gemelkes (Anfangs- oder Endgemelk) aufwies, bevor er schließlich seine Aufmerksamkeit auf den Einfluß der Verfütterung von phosphorsaurem Kalk lenkte. Besonders häufig fiel die Alkoholprobe positiv aus bei Kolostralmilch, Milch frischmelker oder altmelker, euterkranker und euterkrank gewesener Kühe sowie bei "anormaler" Milch, bei Milch von Kühen nach Verkalben, mit Allgemeinerkrankungen, krankhafter Brunst und krankhaften Veränderungen der Geburtswege. (Aufgrund dieser Beobachtungen hielt AUZINGER (1909) die Alkoholprobe (Einzelmilchprobe) zur hygienischen Stallkontrolle von Vorzugsmilchbetrieben für ganz besonders geeignet.) Auch die Verfütterung phosphorsaurer Kalks (insbesondere Calciumphosphat enthaltend) führte bei Kühen, deren Milch zuvor in der Alkoholprobe nicht aufgefallen war, zu positiven Resultaten. AUZINGER vertrat aufgrund seiner Ergebnisse die Ansicht, daß die Alkoholreaktion bei frischer Einzelmilch mit Ausnahme des Kolostrums unabhängig von der Azidität der Milch verläuft und nur durch eine Verschiebung der Milchsäure (insbesondere Calcium) in ihrem Verhältnis zu den Milcheiweißstoffen hervorgerufen wird. Da eine Milch bei der Alkoholprobe um so eher gerinnt, je mehr lösliche Kalksalze in ihr vorhanden sind, ähneln die Vorgänge bei der Alkoholreaktion nach AUZINGER (1909 und 1914) jenen

bei der Labeinwirkung. WEIMAR (1923) beobachtete nach Verfütterung schimmlicher Silage ebenfalls ein gehäuftes Auftreten positiver Reaktionen bei der Alkoholprobe. Er führte dies auf eine Änderung der Milchezusammensetzung zurück und vermutete, daß dabei insbesondere die mono- und dibasischen Phosphate eine wichtige Rolle spielen. SOMMER und BINNEY (1923), SCARLETT und BLOMFIELD (1946) sowie SEEKLES und SMEETS (1947) bestätigten die Angabe von AUZINGER, daß calciumreiches Futter die Ursache einer alkoholempfindlichen Milch sein kann. Weitergehende Untersuchungen von SOMMER und BINNEY (1923) erbrachten, daß durch Erhöhung des Calcium- oder Magnesiumgehaltes der Milch deren Alkoholstabilität herabgesetzt wird, während Kalium, Kochsalz, Phosphate oder Zitrone ohne Effekt waren. Der Zusatz von Calcium oder Magnesium blieb jedoch ohne Einfluß auf den Ausfall der Alkoholprobe, wenn außerdem auch Phosphate oder Zitrone zugesetzt wurden. Daraus schlossen die Autoren, daß der Ausfall der Alkoholprobe bei einer frischen Milch in erster Linie vom relativen Gehalt an Calcium und Magnesium einerseits sowie Phosphat und Zitrone andererseits abhängt, und diese Ionen verantwortlich seien für die häufig fehlende Korrelation zwischen Alkoholreaktion und Azidität bzw. Keimgehalt. Zu einer ähnlichen Aussage hinsichtlich der Bedeutung der erwähnten Ionen für die Alkoholprobe kamen IIZUKA et al. (1961a und b) sowie LABUSCHAGNE (1968). Letztgenannter Autor teilte mit, daß eine geringe Alkoholstabilität Folge eines hohen Gehaltes an löslichem Calcium und eines niedrigen Gehaltes an löslichen anorganischen Phosphaten und löslichen Zitronen sein kann. IIZUKA et al. (1961a und b) fanden bei alkoholempfindlichen Milchproben u.a. einen erhöhten Gehalt an ionisier-

tem Calcium und einen verminderten Gehalt an anorganischem Phosphor, ultrafiltriertem Phosphor, Zitronensäure und Casein. Beim Magnesium wurden unterschiedliche Werte beobachtet. Zuvor hatten bereits MITAMURA (1937), SEEKLES und SMEETS (1947) sowie IIZUKA (1960 und 1961) ebenfalls auf die Bedeutung des Calciumgehaltes der Milch im Hinblick auf deren Alkoholstabilität hingewiesen. Auch nach PURI, MURARI und TOTEJA (1965) kontrolliert insbesondere der Gehalt an löslichem Calcium die Alkoholstabilität ($r = -0,71$), wohingegen der Gehalt an Fett, Protein oder fettfreier Trockenmasse sowie der pH-Wert und die Azidität ohne Einfluß auf die Alkoholprobe seien. Diese Daten stehen hinsichtlich des Fett- und Proteingehaltes allerdings in Widerspruch zu den Angaben von SHIGA et al. (1964), die eine negative Korrelation ermittelt hatten.

2.1.3. Prüfung der Alkoholstabilität mit Alkohol verschiedener Konzentrationen

MORRES (1905), der vermutlich als erster Versuche mit Alkohol verschiedener Konzentrationen (66 bis 72 % nach Tralles) anstellte, kam zu dem Ergebnis, daß ein konzentrierterer Alkohol eine Milch mit niedrigerem Säuregrad eher zur Gerinnung bringt als ein weniger konzentrierter Alkohol. Außerdem registrierte er, daß die Reaktion bei zwei Raumteilen Alkohol auf ein Raumteil Milch bedeutend intensiver ist als bei gleichen Raumteilen Milch und Alkohol, selbst wenn bei der Probe mit der doppelten Menge Alkohol dieser weniger konzentriert ist. So reagierten z.B. 4 ml eines 66 Vol.-%igen Alkohols stärker als 2 ml eines 72 Vol.-%igen Alkohols mit 2 ml der gleichen Milch. HENKEL (1907) bestätigte, daß bei Verdoppelung der Alkoholmenge stets ein niedrigerer Säure-

grad zur Gerinnung der Milch genüge als bei Anwendung der einfachen Menge; die Unterschiede zwischen den Säuregraden, bei denen die Gerinnung der Milch durch die gleiche bzw. doppelte Alkoholmenge erfolge, seien jedoch nicht einheitlich. Daher läßt sich nach Ansicht von HENKEL (1907) auch nicht sagen, daß die doppelte Alkoholprobe in ihrer Wirkung einer Alkoholprobe mit einfacher Menge Alkohol einer bestimmten höheren Konzentration gleichkommt.

Angaben darüber, wann und von wem zuerst die doppelte Alkoholprobe mit 68 Vol.-%igem Alkohol durchgeführt wurde, sind in der Literatur offenbar nicht vorhanden. HENKEL (1907) vermutete, daß diese Probe aus den Bedürfnissen der Praxis hervorgegangen ist und möglicherweise bereits von HOEFT (1898) ins Auge gefaßt wurde. Die doppelte Alkoholprobe fällt nach HENKEL (1907) ab 7,75 bis 8,5° SH positiv aus, nach MORRES (1911) ab etwa 7,4 bis 7,6° SH.

Hinweise auf eine Alkoholprobe mit 70 Vol.-%igem Alkohol finden sich - soweit bekannt - erstmals in der Berliner Polizeiverordnung betr. den Verkehr mit Kuhmilch und Sahne vom 15.3.1902 (REISS, 1904; HENKEL, 1907). Laut § 13 Absatz h dieser Verordnung "muß Kindermilch, die von auswärts bezogen wird, beim Abgeben an die Konsumenten, ohne zu gerinnen, das Abkochen oder die Alkoholprobe (Mischung von 70 %igem - Volumprozent - Alkohol mit Milch zu gleichen Teilen) aushalten". Bei dieser Art der Alkoholprobe soll eine Gerinnung der Milch bei 7,75 bis 8,0° SH (HENKEL, 1920) bzw. 8,25 bis 9,25° SH (HENKEL, 1907) zu beobachten sein.

GROSSE-BOHLE (1907), der das Verhalten von Milch gegenüber Alkohol von 96, 70 bzw. 50 Vol.-% testete, kam zur Überzeugung, daß Kinder- und Vorzugsmilch bei der Alkoholprobe mit doppeltem Volumen 70 Vol.-%igen Alkohols noch nicht gerinnen dürfe, für die Erkennung zersetzter und nicht mehr ohne Nachteile aufkochbarer Marktmilch aber die doppelte Menge 50 Vol.-%igen Alkohols genüge. Er folgerte dies aus seinen Untersuchungen, aus denen hervorging, daß "stark zersetzte Milch" (mindestens 9° SH) mit dem doppelten Volumen 50 %igen Alkohols gerann, während "mäßig zersetzte Milch" (etwa 8 bis 9° SH) nicht mehr mit dem 50 %igen Alkohol, wohl aber mit dem 70 %igen ausflockte. "Frische oder schwach zersetzte Milch" (bis etwa 8° SH) war gegenüber der Probe mit doppelter Menge 70 Vol.-%igen Alkohols stabil (nach HENKEL (1907) ist diese Probe ab 7,5 bis 8,5° SH positiv). MORRES (1911) empfahl ähnliche Prüfungen: bei Vorzugs- und Kindermilch die doppelte Alkoholprobe mit 68 Vol.-%igem Alkohol oder eine verschärfte Alkoholprobe mit 70 bis 72 Vol.-%igem Alkohol, bei Marktmilch die Alkoholprobe mit einfacher Menge 50 Vol.-%igen Alkohols. Mit der letztgenannten Probe wurden nach seinen Beobachtungen alle Milchsorten herausgefunden, die mindestens 10° SH erreicht hatten und sich höchstens noch 2 bis 3 Stunden hielten. FENDLER und BORKEL (1911) vertraten die Ansicht, daß die doppelte Probe mit 50 Vol.-%igem Alkohol für die Beurteilung des Frischezustandes von Marktmilch zwar zur Vorprüfung bei der ambulanten Nahrungsmittelkontrolle geeignet sei, ihr eine ausschlaggebende Bedeutung jedoch nicht zuerkannt werden dürfe, da keine festen Beziehungen zwischen Alkoholprobe und Säuregrad beständen. Aufgrund dieser bereits zuvor von anderen Autoren (MORRES, 1905,

1909 und 1911; HENKEL, 1907) beschriebenen Unregelmäßigkeiten zwischen Ausfall der Alkoholprobe und Säuregrad wurde die Alkoholprobe später kaum mehr zur Ermittlung des Säuregrades herangezogen, ohne daß sie dadurch in ihrer Bedeutung als Methode zur Bestimmung der Haltbarkeit bzw. des Frischezustandes verlor. Diesen speziellen Wert der Alkoholprobe hatte MORRES im übrigen bereits 1905 hervorgehoben.

2.1.4. Beziehungen zwischen Alkoholstabilität und Keimgehalt

MORRES (1911) war auch der erste, der bemerkte, daß die Alkoholprobe - die er als Alizarolprobe durchführte - "mit der Reduktaseprobe in gewissen Beziehungen steht und alle diejenigen Milchproben anzeigen kann, welche in weniger als 16 Minuten das Methylenblau entfärben". Dabei reagierte das Alizarol um so intensiver, je rascher die Reduktion eintrat: In 5 Minuten reduzierende Milch gab mit Alizarol eine sehr dickflockige Gerinnung und gelblichbraune Färbung. LOEHNIS (1914) wies jedoch darauf hin, daß "normale Handelsmilch bei dieser Alkoholprobe auch dann noch nicht immer gerann, wenn ihr Keimgehalt bereits sehr hoch angestiegen war". Er hielt daher eine Verschärfung des Verfahrens für unbedingt erforderlich und prüfte, inwieweit 70, 80 bzw. 90 Vol.-%iger Alkohol für diese Zwecke geeignet war. Außerdem führte er die Versuche nicht in Form einer verschärften Alkoholprobe mit einfachem bzw. doppeltem Volumen an Alkohol aus, sondern ließ den Alkohol bis zum ersten Auftreten von Gerinnsel in die in einem Becherglas befindliche, vorsichtig bewegte Milch (2 ml) eintropfen. Die Anzahl der bis zur

Flockenbildung in der Milch verbrauchten ml Alkohol ergab die "Alkohol-Zahl". Die Bestimmung des Endpunktes war nach Angabe des Autors nur dann schwierig, wenn mehr als 6 ml Alkohol verbraucht wurden, sonst wurden bei Parallelbestimmungen nur Abweichungen von höchstens 0,1 ml registriert. Bei frisch ermolkenen Einzelgemelken ergaben sich im Gegensatz zur Mischmilch stark differierende "Alkohol-Zahlen", bei letzterer leitete LOEHNIS aufgrund seiner Ergebnisse an 73 Proben jedoch folgende Beziehung ab:

Niedriger Keimgehalt	($< 10^5$ /ml):
	>4 ml 80 Vol.-%igen Alkohols
Mittlerer Keimgehalt	(bis ca. 4×10^6 /ml):
	2 bis 4 ml 80 Vol.-%igen Alkohols
Hoher Keimgehalt	(bis ca. 5×10^7 /ml):
	<2 ml 80 Vol.-%igen Alkohols
Sehr hoher Keimgehalt	(über 5×10^7 /ml):
	<2 ml 70 Vol.-%igen Alkohols.

LOEHNIS vertrat aufgrund dieser Resultate die Ansicht, daß die Feststellung der "Alkohol-Zahl" insbesondere mit 80 Vol.-%igem Alkohol eine gute Schnellmethode zur Ermittlung des ungefähren Keimgehaltes von Mischmilch sei. KOOPER (1914) gelang es jedoch nicht, die Eignung dieses Titrationsverfahrens zu bestätigen, da der Endpunkt der Titration häufig nicht genau fixiert werden konnte und bei Parallelbestimmungen Differenzen von 0,5 bis 2 ml ermittelt wurden - je nachdem, ob der Alkohol langsamer oder schneller zur Milch zutropfte. Er modifizierte daher das Verfahren und beschickte pro Probe 24 Reagenzgläser mit jeweils 2 ml Milch und steigenden Mengen 80 Vol.-%igen Alkohols (von 0,25 bis

6 ml, jeweils in Stufen von 0,25 ml). Die Alkoholmenge des Röhrchens, in dem sich eine sehr feine Gerinnung deutlich bemerkbar machte, wurde als "Alkoholzahl" bezeichnet. Aus der Übersicht 1 wird ersichtlich, daß die Übereinstimmung

Übersicht 1: Alkoholzahl, Keimzahl, Azidität und Reduktionsvermögen von Sammelmilch (nach KOOPER)

Alkoholzahl	Keimzahl/ml	SH ⁰	Reduktion (Entfärbung/min)
3,0	13.000	6,0	12
3,0	34.000	6,0	10
3,0	52.000	6,4	11
3,5	41.600	6,4	14
3,8	14.300	6,0	11
4,2	33.800	6,2	12
4,6	12.000	6,2	13
4,9	12.800	6,0	15

mit Keimzahl, Reduktion bzw. Säuregrad nur begrenzt war. Allerdings handelte es sich bei den untersuchten Milchproben um besonders keimarme Proben. Unter dem Hinweis auf diese Ergebnisse meldete KOOPER erhebliche Zweifel an der Eignung der Alkoholtitration als Schnellmethode zur Ermittlung des Keimgehaltes an. Auch AYERS und JOHNSEN (1915) konnten keine engen Beziehungen zwischen Alkoholreaktion und Keimzahl bzw. Säuregrad feststellen: 35 Rohmilchproben mit 2.100 bis 21.200.000 Keimen/ml und einer Azidität von 0,14 bis 0,32 % wurden durch 75 Vol.-%igen Alkohol ausgefällt, während 142 Proben mit einer Azidität von 0,09 bis 0,19 %

und Keimzahlen von 2.000 bis 19.000.000/ml alkoholstabil waren. CHALMERS (1928) empfahl daher, die zu untersuchenden Proben mindestens 8 Stunden bei 37° C vorzubebühen und 83 Vol.-%igen Alkohol (mit Methylrot als Indikator) zu verwenden. Er erzielte mit dieser Modifikation der Alkoholprobe eine recht gute Übereinstimmung zwischen Alkoholreaktion und Keimgehalt bzw. Haltbarkeit. Dem 83 Vol.-%igen Alkohol wurde von CHALMERS (1928) der Vorzug gegenüber 70, 73 bzw. 78 Vol.-%igen Alkoholen gegeben, da auf diese Weise auch weniger stark keimhaltige Proben erfaßt wurden. DU TOIT, LÜCK und VAN TONDER (1970) konnten vor einigen Jahren den positiven Einfluß der Vorbebrütung der Milchproben bestätigen. Die Korrelation zwischen Keimzahl und Alkoholstabilität, die bei nicht vorinkubierten Proben nur $r = 0,42$ betrug, lag nach Prä-Inkubation von 5 Stunden bei 30° C bzw. 20 Stunden bei 15° C bei $r = 0,77$ bzw. $r = 0,75$. Als Beispiele für die Abschätzung des Keimgehaltes aufgrund der Alkoholreaktion wurden angegeben, daß 5 Stunden bei 30° C vorinkubierte und in der Alkoholprobe (50 bzw. 60 %) positive Milchproben bei der Anlieferung höchstwahrscheinlich mehr als 10^7 Keime/ml bzw. mehr als 2×10^6 Keime/ml enthielten. Aus ihren Ergebnissen leiteten die Autoren ferner ab, daß die Alkoholprobe bei Prä-Inkubation der Milchproben mit der gleichen Berechtigung wie andere Tests (z.B. Reduktionsprobe) zur Gütebeurteilung der Milch herangezogen werden könnte. Für eine Einteilung der Milch in drei Güteklassen würden dann Alkoholproben mit zwei verschiedenen Alkoholkonzentrationen durchgeführt werden müssen. Nach Ansicht des KOLLEGIUMS DER BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG (1969) ermöglichen Alkoholproben für die Beurteilung der mikrobiologischen

bzw. hygienischen Qualität der Rohmilch keine genügend scharfe Differenzierung in bezug auf den Keimgehalt. Sie sollten daher durch objektivere und zweckentsprechendere Untersuchungsmethoden ersetzt werden.

2.1.5. Bedeutung der Alkoholstabilität als Parameter der hygienischen Qualität von Rohmilch

In den 40er Jahren begann man der Alkoholprobe im Hinblick auf eine mögliche Eignung als Schnellmethode zur Bestimmung der hygienischen Qualität bei der Annahme (CLEGG, 1952), insbesondere in Großbritannien, Aufmerksamkeit zu schenken - häufig im Vergleich zu den Reduktionsproben mit Resazurin bzw. Methylenblau. Dabei wurden die Untersuchungen mit Alkohol folgender Konzentrationen vorgenommen:

50 Vol.-% (HIGGINBOTTOM, 1948);

68 Vol.-% (ANDERSON und WILSON, 1945; HIGGINBOTTOM, 1948;
HUGHES und ELLISON, 1949; JONES-EVANS, 1949;
MATTICK et al., 1950; SCORTESCO und CACIULARU,
1962);

72 Vol.-% (HUGHES und ELLISON, 1949; JONES-EVANS, 1949);

75 Vol.-% (HIGGINBOTTOM, 1948; HEINTZBERGER, 1958);

76 Vol.-% (HUGHES und ELLISON, 1949; JONES und THOMAS,
1955);

80 Vol.-% (HIGGINBOTTOM, 1948; JONES und THOMAS, 1955;
HEINTZBERGER, 1958).

THOMAS und PHILLIPS (1942) beobachteten, daß 92 % der im 10 Minuten-Resazurinreduktionstest als Milchproben sehr schlechter Qualität (Disc 0) beurteilten Proben eine posi-

tive Alkoholprobe erbrachten und der Anteil der positiven Proben bis zu Disc 3 stetig abnahm; Proben, bei denen der Reduktionstest besser als Disc 3 ausfiel, waren nie in der Alkoholprobe positiv. BARKWORTH (1943) bestätigte, daß die meisten Milchproben, die bei dem 10 Minuten-Resazurintest schlecht bewertet wurden (Disc 3 1/2 und weniger), bei der Alkoholprobe ausgefällt wurden, wies aber gleichzeitig darauf hin, daß zwischen dem Ausfall der Alkoholprobe und der Methylenblaureduktionsprobe eine größere Diskrepanz bestand. SCORTESCO und CACIULARU (1962), die die Milchproben abweichend von den genannten Autoren entsprechend ihrem Farbton bei dem Resazurinreduktionstest (nach 1 Stunde bzw. 10 Minuten) in vier Klassen einteilten, stellten fest, daß bei dem einstündigen Test 89,3 % der Proben der vierten Klasse ($\hat{=}$ $> 10^7$ Keime/ml) und 5,6 % der dritten Klasse ($\hat{=}$ ca. 3 bis 10×10^6 Keime/ml) auch in der Alkoholprobe (68 Vol.-%) positiv waren. Beim 10 Minuten-Test waren sogar 74,2 % der Proben der dritten und 100 % der Proben der vierten Klasse bei der Alkoholprobe geronnen. Infolgedessen waren die Autoren der Meinung, daß die Alkoholprobe ein gut geeigneter Test zur Erkennung von Milchproben schlechter hygienischer Qualität sei.

Andere Autoren äußerten sich weniger optimistisch. HIGGIN-BOTTOM (1948) fand bei der Bestimmung verschiedener Kriterien, und zwar Methylenblau- und Resazurinreduktionsprobe, Azidität, Alkoholproben, Haltbarkeit in Form des C.O.B.-Tests (Kochprobe), daß die Reduktionsproben eine engere Korrelation zur Haltbarkeit der Milch aufwiesen als die Alkoholproben und daß von den Alkoholproben diejenige mit 68 Vol.-%igem Alkohol besser mit der Haltbarkeit über-

einstimmte ($r = 0,42$) als diejenige mit 50, 75 bzw. 80 Vol.-%igem Alkohol. Von den Proben mit einer Haltbarkeit (C.O.B.-Test) von weniger als 24 Stunden fielen 61 % bei 80 Vol.-%igem Alkohol auf, 31 % bei 75 Vol.-%igem, 26 % bei 68 Vol.-%igem und 17 % bei 50 Vol.-%igem Alkohol; bei einer Haltbarkeit von 24 bis 36 Stunden lauteten die entsprechenden Werte: 42 %, 16 %, 10 % bzw. 7 %. Aus der Übersicht 2 geht hervor, daß andererseits häufig ein weitaus geringerer

Übersicht 2: Prozentuale Übereinstimmung zwischen positiver Alkoholprobe und anderen zu beanstandenden Kriterien (nach HIGGINBOTTOM)

Alkoholkonzentration	Anteil der Proben %				
	Haltbarkeit		M.B.R.T.		R.R.T.
	<24 Std.	24-36 Std.	15 Min.	30 Min.	4 1/2 Std.
50	34	57	40	45	36
68	36	62	47	53	41
75	25	56	27	34	23
80	17	49	16	20	11

Zeichenerklärung: M.B.R.T. $\hat{=}$ Methylenblaureduktionsprobe
R.R.T. $\hat{=}$ Resazurinreduktionsprobe

Prozentsatz der bei den Alkoholproben positiven Milchproben auch bei den anderen Tests aufgefallen war. Die Autorin kam bei der abschließenden Beurteilung der verschiedenen Tests zur Feststellung, daß die Alkoholprobe aufgrund der von unerfahrenem Personal nicht immer ganz einfachen Beurteilung ihres Reaktionsausfalles und ihrer geringeren Beziehung zur Haltbarkeit weniger gut geeignet sei als die Reduktionsproben, auch wenn der Zeitaufwand erheblich geringer sei. Auch

HUGHES und ELLISON (1949), JONES-EVANS (1949) sowie JONES und THOMAS (1955) vertraten die Ansicht, daß ein zu hoher Prozentsatz der Milchproben, die bei dem Resazurinreduktionstest als Proben schlechter Qualität (Disc 3 1/2 und weniger) beurteilt wurden, selbst bei einer verschärften Alkoholprobe nicht erfaßt werden könne (Übersicht 3).

JONES und THOMAS (1955) empfahlen als Screening-Test für die Anlieferungsmilch eine Kombination von Alkoholreaktion mit 80 bzw. 76 Vol.-%igem Alkohol und Wasserstoffionenkonzentration. DU TOIT, LÜCK und VAN TONDER (1970) berichteten jedoch später, daß die Kombination von Alkoholprobe und pH-Bestimmung keine Verbesserung der Alkoholprobe darstelle. Diese Autoren glaubten, daß die Alkoholprobe allein ausreiche, um eine Entscheidung hinsichtlich der Verarbeitungsfähigkeit der angelieferten Milch zu treffen; auf die zur Diskussion gestellte Eignung der Alkoholprobe (nach Prä-Inkubation der Milchprobe) als System zur Gütebeurteilung wurde bereits eingegangen.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß in den Niederlanden gebietsweise die Alkoholprobe bereits vor einigen Jahren mit herangezogen wurde, um die Rohmilch vorzusortieren (HEINTZBERGER, 1958). Milchproben, die bei der Alkoholprobe mit 80 Vol.-%igem Alkohol nicht ausflockten, wurden ohne weitere Tests sogleich der ersten Güteklasse zugeordnet, da sie dann weniger als 0,01 % Milchsäure enthielten. Milchproben, die bei dieser Alkoholprobe positiv reagierten, wurden anschließend der Alkoholprobe mit 75 Vol.-%igem Alkohol unterzogen. Sofern jetzt erneut eine Gerinnung zu beobachten war, wurde die Milch nicht angenommen, da in ihr

Übersicht 3: Vergleich von Reduktionsprobe und Alkoholprobe

Reduktions- probe (Disc)	Anteil der Proben bei Alkoholprobe mit										Autor
	68		72		76		80 Vol.-%				
	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.			
0 - 1/2	66,2	33,8	77,7	22,3	83,5	16,5				HUGHES und ELLISON (1949)	
1 - 3 1/2	37,8	62,2	10,8	89,2	5,4	94,6					
4 - 6	1,8	98,2	1,8	98,2	4,5	95,5					
0 - 1/2			72,2	27,8						JONES- EVANS (1949)	
1 - 3 1/2			18,6	81,4							
4 - 6			1,3	98,7							
0 - 1/2					95,7	4,3	100,0	0		JONES und THOMAS (1955)	
1 - 3 1/2					60,0	40,0	80,0	20,0			
4 - 6					35,2	64,8	57,0	43,0			

mit Sicherheit mehr als 0,015 % Milchsäure vorhanden waren. Bei allen Proben, die bei dieser Alkoholprobe jedoch negativ reagierten, wurde am darauffolgenden Tage der Milchsäuregehalt ermittelt und die Klassifizierung entsprechend dem Ausfall dieser Bestimmung vorgenommen. Von dem KOLLEGIUM DER BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG (1969) wurde allerdings bezweifelt, ob solchen Untersuchungen überhaupt noch eine genügende Objektivität zugesprochen werden kann bzw. ob sie unter Tolerierung der einzuräumenden Fehlergrenze für Massen- und Schnelluntersuchungen noch reproduzierbare Ergebnisse liefern.

2.2. Verfahren zur Bestimmung der mikrobiologischen Beschaffenheit von Rohmilch

Zur Ermittlung der mikrobiologischen Beschaffenheit der Rohmilch werden vorwiegend Methoden angewendet, die auf der Bestimmung der Gesamtkeimzahl oder der Stoffwechselaktivität der Keime beruhen.

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl können direkte und indirekte Verfahren herangezogen werden. Die mikroskopische Keimzählung nach BREED (1911) und die daraus entwickelten Modifikationen (Angaben dazu unter anderem bei DEMETER (1967), SIEMERS (1968), KOLLEGIUM DER BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG (1969), THOMAS (1970), AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1972)) finden für Routineuntersuchungen kaum mehr Anwendung (ZAADHOF und TERPLAN, 1973). Bei der Instant-Keimzählmethode (GODBERSEN, 1972; 1973a, b und c; KYNAST, 1973a und b) handelt es sich um eine Kombination der BREED'schen Methode und der Membranfiltermethode.

Gebräuchlicher sind indirekte Keimzählverfahren, speziell das Gußplattenverfahren (Koch'sches Plattenverfahren). Der Anwendung dieser Methode bei Routineuntersuchungen steht jedoch insbesondere der hohe Zeit- und Materialaufwand bei Durchführung des Verfahrens in der konventionellen Art und Weise entgegen (BLAU, 1960; u.a.). Die Entwicklung auf dem Sektor der Laboratoriumstechnik bietet jedoch durch Verwendung von Dosier- bzw. Verdünnungsgeräten (ZAADHOF und TERPLAN, 1973) sowie Geräten zur automatischen Abfüllung des Nährmediums (BRADSHAW, FRANCIS und READ, 1971; SHARPE, BIGGS und OLIVER, 1972) gute Aussichten für die Rationali-

sierung des Gußplattenverfahrens. Erst kürzlich stellte die Firma Foss Electric "das erste Gerät" vor, mit dem nicht nur eine automatische Agarabfüllung möglich ist, sondern auch "eine automatische Milchprobenahme, Beimpfung und Behandlung der Petrischalen sowie Kühlung". Die das Gerät verlassenden Petrischalen sind automatisch nummeriert und fertig für die Bebrütung (N.N., 1975). Für die Auswertung der Kolonienwachstum aufweisenden Platten bietet sich die Computer-Bild-Analyse (MANSBERG, 1957; MALLIGO, 1965; GLASER und WATTENBURG, 1966; INGELS, DAUGHTERS und BURZIO, 1968; TOLLE et al., 1972; WERNERY, 1972; JEUNET et al., 1973; WERNERY et al., 1973; PACKARD und GINN, 1974; HEESCHEN et al., 1975; MARTENS und MORTON, 1975; SHARPE und MICHAUD, 1975; SUHREN, 1975) an. Auf diese Weise können die einzelnen Kolonien wesentlich schneller, zuverlässiger und genauer gezählt werden als es menschliche Arbeitskräfte vermögen (WERNERY, 1972). Die Übereinstimmung zwischen den Zählergebnissen der Gesamtkeimzahlbestimmung mittels Computer-Bild-Analyse und den visuellen Zählbefunden ist nach Ansicht dieses Autors sehr gut (bei Rohmilch z.B. $r = + 0,98$).

Eine der verschiedenen Modifikationen des Koch'schen Plattenverfahrens stellt das Platten-Ösen-Verfahren (Plate loop method) dar (THOMPSON, DONNELLY und BLACK, 1960; TATINI, DABBAH und OLSON, 1967; THOMPSON und BLACK, 1967; WRIGHT et al., 1970; BRADSHAW, FRANCIS und READ, 1971; LIMMER und WÖBBECKE, 1972; LIMMER, 1973a und b; SPILLMANN, 1973; POSTHUMUS, KLIJN und GIESEN, 1974), das auch in mechanisierter Form zur Anwendung kommen kann. Bis zu Keimzahlen von 200.000 /ml sollen die Ergebnisse des

Platten-Ösen-Verfahrens gut mit jenen des Koch'schen Plattenverfahrens übereinstimmen (WRIGHT et al., 1970), während oberhalb dieses Bereichs progressiv ansteigende Differenzen zu beobachten sind.

Bei der elektronischen Mikrokoloniezählung (TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN, 1966 und 1968) handelt es sich um eine Methode, die die Möglichkeiten des Koch'schen Plattenverfahrens mit der Präzision und Schnelligkeit des elektronischen Partikelzählverfahrens verbinden soll. GUNSTHEIM (1971) hat die bis zu diesem Zeitpunkt erschienene Literatur ausführlich referiert und über deren Vor- und Nachteile umfassend informiert. Auch JOHST (1971), ZAADHOF und TERPLAN (1971), GERIGK (1972), PAUL und NITSCH (1972 und 1974) sowie SUHREN (1975) haben sich in ähnlicher Weise zur Methodik geäußert. KIND (1972) prüfte die Eignung der elektronischen Mikrokoloniezählung im Hinblick auf eine Qualitätsbeurteilung der Rohmilch und schlug folgende Grenzwerte für die Gütebewertung vor:

< 250.000 /ml (Güteklasse I)
250.000 bis 500.000 /ml (Güteklasse II)
und > 500.000 /ml (Güteklasse III).

Später wiesen KIND, BILLMAYER und UBBEN (1975) auf die durch Anwendung dieses Verfahrens erreichte Qualitätsverbesserung der Rohmilch in Schleswig-Holstein hin (Keimgehaltsabnahmen um 55 bis 80 %).

Auf die verschiedenen Möglichkeiten des Oberflächenverfahrens, die zum Teil eine Auswertung nach Wahrscheinlichkeitsmathematischen Prinzipien erfordern, soll an

dieser Stelle nicht eingegangen werden (ausführliche Angaben bei SIEMERS (1968) und THOMAS (1970)). Inwiefern die von CAMPBELL und GILCHRIST (1973) sowie GILCHRIST et al. (1973) beschriebene Modifikation, bei der eine geringe Menge der unverdünnten Probe auf einer rotierenden Agarplatte in Form einer Spirale aufgetropft wird, besondere Vorteile erbringt, ist nicht bekannt. Zur Auszählung kann hierbei im übrigen auch ein Laser-Scanner eingesetzt werden, der die Zahl/Volumen-Information erstellt (READ et al., 1975).

Hinsichtlich anderer mikrobiologischer Verfahren (z.B. Membranfilterverfahren, Verdünnungsverfahren, Papierstreifenverfahren) wird auf die Literaturangaben bei SIEMERS (1968) und THOMAS (1970) verwiesen.

Von den auf der Stoffwechselaktivität der Keime beruhenden Methoden zur Ermittlung der hygienischen Qualität der Rohmilch sind insbesondere die Reduktionsproben und die Verfahren zur Bestimmung von Pyruvat bzw. Laktat von Bedeutung.

Die mit geringen Kosten verbundenen, einfach durchzuführenden und schnell zu bewertenden Reduktions-Tests beruhen auf der Senkung des Redox-Potentials der Milch, vorwiegend durch reduzierende Fermente der Keime. Auf die Problematik der Reduktionsproben - bei verzögerter oder ausbleibender Reduktion ist kein Rückschluß auf den Keimgehalt möglich und zulässig - wird schon seit langem hingewiesen, insbesondere seit sich die Tiefkühlung der Milch immer mehr durchsetzt. Der Ausfall der Reduktionsproben kann nämlich

durch verschiedene Faktoren beeinflußt werden: Unterschiedliches Reduktionsvermögen der einzelnen Keimarten - Milchsäurestreptokokken und coliforme Keime haben z.B. ein relativ starkes Reduktionsvermögen, wohingegen Mikrokokken, Pseudomonaden sowie Sporenbildner nur in sehr geringem Maße reduzierend wirken -; Temperaturabhängigkeit der Fermentaktivität von Bakterien - in gekühlter Milch sind die mesophilen Mikroorganismen inaktiv, während die psychrotrophe Flora nur sehr langsam reduziert (auch durch Vorbebrütung tiefgekühlter Milch können Fehlergebnisse nicht ausgeschaltet werden) -; Aufrauhmung; Lichteinwirkung; Luftzutritt; bakterielle Stoffwechselprodukte; Hemmstoffe und hoher Leukozytengehalt (ZAADHOF und TERPLAN, 1973).

Seit Anfang der 70er Jahre wird die Eignung von Laktat (TOLLE et al., 1971) und Pyruvat (TOLLE et al., 1972) als Parameter der hygienischen Wertigkeit von Milch zur Diskussion gestellt, ohne daß bisher endgültig geklärt ist, ob eines dieser Verfahren die Reduktionstests im Hinblick auf eine Gütebeurteilung der Rohmilch ablösen kann. Da KOHLER (1974) sowie HEESCHEN et al. (1975) die diese Fragestellung betreffende Literatur ausführlich referiert haben, kann an dieser Stelle auf eine weitere Besprechung verzichtet werden.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material

In der Zeit von März 1974 bis Mai 1975 (mit Ausnahme von Juli 1974) wurden in einer oberbayerischen Molkerei Waagemilchproben gezogen. Für die Probenahme, die abgesehen von Juni, August und November 1974 sowie Februar 1975 monatlich zweimal im Abstand von ca. 14 Tagen - im September 1974 viermal - erfolgte, wurde jeweils die Rohmilch von den gleichen 25 Erzeugern gewählt, die - wie aus vorhergehenden Untersuchungen bekannt war - im allgemeinen Milch mit einem Keimgehalt von ca. 10^5 bis 10^6 /ml ablieferten. Ab Januar 1975 wurde die monatliche Probenzahl aus versuchs-technischen Gründen etwas verringert. Die Milch wurde jeweils in Kannen angeliefert, vom 1. Mai bis einschließlich 10. Oktober zweimal täglich, vom 11. Oktober bis 30. April einmal täglich. Die Probenahme selbst erfolgte nach gründlicher Durchmischung des Waageinhaltes mittels Schöpfkelle, die vor jeder Entnahme einer Probe gründlich mit heißem Wasser abgespült und mit Brennsplritus abgeflammt wurde. Die Proben wurden in 20 ml fassende Reagenzfläuser gegeben, die das von HEESCHEN et al. (1969) beschriebene Konservierungsmedium in Form eines Lyophilisates enthielten (für die elektronische Mikrokoloniezählung sowie Bestimmung des Pyruvat- und Laktatgehaltes wurde ein zweites Röhrchen benötigt). Die Proben wurden in Kühltaschen zum Labor befördert und bis zur Untersuchung kühl aufbewahrt. (Die elektronische Mikrokoloniezählung erfolgte erst am nächsten Tag.)

3.2. Methodik

3.2.1. Alkoholstabilität

Aufgrund der in der Literatur zu findenden Angaben (siehe 2.1.) wurde in Vorversuchen die Eignung 74, 75, 76, 77, 80, 83, 85 bzw. 90 Vol.-%igen Alkohols, hergestellt jeweils aus säurefreiem 96 Vol.-%igem Alkohol, zur Durchführung einer verschärften Alkoholprobe bei Anlieferungsmilch unterschiedlicher mikrobiologischer Qualität geprüft. Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß eine Einstufung der Milchproben in verschiedene Klassen am besten mit 77, 80 und 83 Vol.-%igem Alkohol vorgenommen werden konnte. Mit den 74, 75 und 76 Vol.-%igen Alkoholen blieben sehr viele Proben negativ, mit den 85 und 90 Vol.-%igen Alkoholen wurden nahezu alle Proben ausgefällt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die eigentlichen Versuche mit den drei erstgenannten Alkoholkonzentrationen durchgeführt, und zwar in Form einer Probe mit einfacher wie auch doppelter Menge Alkohol (im weiteren wird die Probe mit der einfachen Menge Alkohol als "einfache Alkoholprobe", die Probe mit der doppelten Menge Alkohol als "doppelte Alkoholprobe" bezeichnet). Bei der "einfachen Alkoholprobe" wurden gleiche Raumteile (1 ml) Milch und Alkohol gemischt, bei der "doppelten Alkoholprobe" wurden auf 1 Raumteil Milch 2 Raumteile Alkohol gegeben. Bei allen Versuchen wurde der Alkohol der bereits im Reagenzglas abgefüllten Milchprobe zugesetzt, da im umgekehrten Fall "leicht eine feinflockige Gerinnung an den Grenzzonen der durch den leichteren Alkohol hindurchtretenden Milch eintreten kann, was aufgrund von nach der Durchmischung an der Glaswand zu findenden Flocken möglicherweise Anlaß für Fehlbeurteilungen geben kann" (AUZINGER, 1909).

Die Reagenzgläser wurden anschließend verschlossen und durch zwei- bis dreimaliges sanftes Umschütteln gut durchmischt. Nach einer Minute wurde die Probe beurteilt (METHODENBUCH, 1970). Alle Proben, bei denen eine Gerinnung zu beobachten war, wurden unabhängig vom Grad der Gerinnung (sehr feinflockig, feinflockig, flockig, grobflockig) als positiv bezeichnet. Als negativ gelten Proben, bei denen die Milch mit verringerter Viskosität seifenwasserartig in Form von "geschlängelten Schlieren" an der Glaswand herabließ (HENKEL, 1907; AUZINGER, 1909).

3.2.2. Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl aller 603 Proben erfolgte im Koch'schen Plattenverfahren entsprechend der Empfehlung des INTERNATIONALEN MILCHWIRTSCHAFTSVERBANDES (1958). Allerdings fand nicht das dort vorgeschlagene Standard-Vergleichs-medium Anwendung, sondern Plate Count Agar (Oxoid, CM 325). Angesetzt wurden jeweils die Milchverdünnungen 10^{-2} bis einschließlich 10^{-5} . Die Auswertung der Platten wurde nach 48-stündiger Bebrütung bei 30°C vorgenommen. Ausnahmsweise wurden auch Proben mit Koloniezahlen unter 30 /Platte bei der Verdünnungsstufe 10^{-2} berücksichtigt bzw. solche mit mehr als 300 Kolonien/Platte bei der Verdünnungsstufe 10^{-5} .

Im Rahmen anderer, im März bis Mai, Oktober und Dezember 1974, durchgeführter Versuche wurde bei 149 der 603 Proben der Keimgehalt auch mittels der elektronischen Mikrokoloniezählung (EKZ) bestimmt. Diese Untersuchungen wurden entsprechend der von TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN (1968) beschriebenen Methode vom Tiergesundheitsdienst Bayern (Außenstelle Kempten) durchgeführt. Die dabei registrierten Ergebnisse wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2.3. Pyruvat- und L(+)-Laktatgehalt

Bei den 149 Proben, die der elektronischen Mikrokoloniezählung (3.2.2.) unterworfen wurden, wurde auch der Pyruvatgehalt ermittelt, desweiteren bei 143 dieser 149 Proben der Gehalt an L(+)-Laktat. Die Bestimmungen wurden von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch im Auto-Analyzer-II-System (Technicon) durchgeführt. Ausführliche Angaben zur Methodik enthält die Arbeit von KOHLER (1974).

3.2.4. Psychrotrophe Keime

Zur Erfassung der psychrotrophen Keime wurde entsprechend der von der AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1972) vorgeschlagenen Standardmethode vorgegangen (Koch'sches Plattenverfahren mit Plate Count Agar als Medium, Inkubation bei 7° C für 10 Tage). Angesetzt wurden jeweils die Milchverdünnungen 10^{-2} bis einschließlich 10^{-5} .

3.2.5. Coliforme Keime

Der Nachweis der coliformen Keime erfolgte sowohl mit der vom INTERNATIONALEN MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND (1966) vorgeschlagenen Standard-Routinemethode als auch mit Hilfe eines erstmals von TERPLAN (1965) empfohlenen, zwischenzeitlich modifizierten Stempelverfahrens.

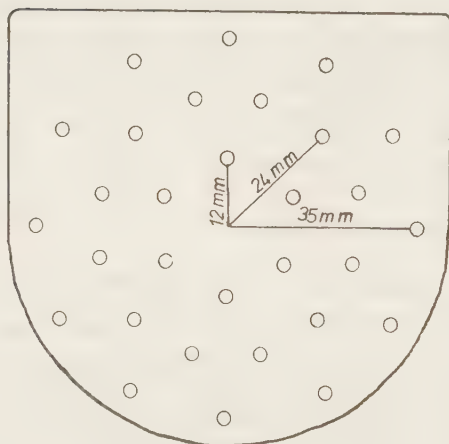
3.2.5.1. Standard-Routinemethode

Als Nährmedium diente Neutralrot-Galle-Laktose-Agar (Oxoid, CM 107). Nach Vermischen der Milchverdünnungen (10^{-1} bis einschließlich 10^{-4}) mit dem Medium, Verfestigung des Mediums und Überschichtung mit dem gleichen Medium wurden die Platten für 24 Stunden bei 30°C inkubiert und ausgewertet.

3.2.5.2. Stempelverfahren

Der ursprünglich von TERPLAN (1965) beschriebene Stempel wurde hinsichtlich der Form und Anordnung der einzelnen Elemente abgewandelt. Bei dem während der eigenen Versuche eingesetzten Stempel waren 30 Elemente auf einer planen Halteplatte aus Aluminium befestigt. Die Elemente waren dabei auf 3 Kreise verteilt: Der innere, vom Zentrum 12 mm entfernte Kreis bestand aus 6 Elementen, der mittlere (24 mm vom Zentrum entfernt) wie auch der äußere Kreis (Abstand vom Zentrum: 35 mm) wiesen jeweils 12 Elemente auf (Abb. 1). Die 35,3 mm langen Elemente waren aus einem massiven Metallstab (V2A-Stahl) mit einem Durchmesser von 3 mm angefertigt. Diese Stärke wurde aufgrund einiger Vorversuche gewählt, da alle 30 Elemente bei diesem Durchmesser zusammen ca. 0,1 ml abgeben konnten. Vor Versuchsbeginn wurde an Aqua dest., Milch und Milchverdünnungen geprüft, inwieweit der bei der Anfertigung angestrebte Wert auch zu erreichen ist. Zu diesem Zweck wurden die zu testenden Proben entsprechend den Angaben von SIEMERS (1968) in Mengen zu 20 ml in Petrischalen abgefüllt, in die dann die zuvor mit Alkohol abgeflamten und wieder abgekühlten Elemente bis auf den

Abb. 1: Stempel mit 30 Elementen



Tab. 1: Dosierung des Stempels bei verschiedenen Flüssigkeiten

Art der Flüssigkeit		Abgegebene Menge in mg ($\bar{x}$)	v (%)
Milch		98,4	8,0
Milch- ver- dünnung	10^{-1}	101,0	8,2
	10^{-2}	101,0	7,5
	10^{-3}	101,0	10,0
Aqua dest.		101,0	10,1

$\bar{x} \hat{=}$ Mittelwert aus 20 Beobachtungen

Petrischalenboden eingetaucht wurden. Die Auszugsgeschwindigkeit wurde entsprechend den Angaben von SCHAEFER (1966) mit ca. 25 cm/sec. festgelegt. Die Abgabe der aufgenommenen Flüssigkeit erfolgte durch einmaliges, ca. 2 sec. währendes Aufsetzen der Elemente auf mit 15 ml Desoxycholat-Agar (Oxoid, CM 163) beschickte Petrischalen. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Agaroberfläche trocken war (Vortrocknung der Platten) und somit eine gute Aufnahme der Flüssigkeiten gewährleistete. Die beim Aufsetzen des Stempels von den 30 Elementen abgegebene Flüssigkeitsmenge konnte nach sich sofort anschließendem Wägen aus der Gewichtszunahme berechnet werden. Dabei ergab sich (Tab. 1), daß tatsächlich von den 30 Elementen etwa 0,1 ml abgegeben wurde, wobei die Menge bei Milch etwas geringer war als bei den Milchverdünnungen bzw. dem Aqua dest. Durch zusätzliche Versuche ließ sich feststellen, daß nach erstmaligem Aufsetzen der Elemente auf dem Agar an einzelnen Elementen noch etwas Flüssigkeit haftenblieb (im Durchschnitt 37,4 mg pro 30 Elemente bei der Milch, 25,4 bis 21,3 mg bei den Milchverdünnungen bzw. 21,1 mg bei Aqua dest.).

Bei den eigentlichen Versuchen zum Nachweis coliformer Keime mit dem Stempel wurde im Prinzip in der beschriebenen Form vorgegangen. Untersucht wurden die Milchverdünnungen 10^{-1} mit 10^{-3} (jeweils 1 Platte/Verdünnungsstufe) ebenfalls auf Desoxycholat-Agar, dem aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen der Vorzug gegenüber dem Neutralrot-Galle-Laktose-Agar gegeben wurde. Nach Antrocknung der Milchverdünnungen wurden die Platten für 24 Stunden bei 30° C bebrütet. Für die Auswertung wurde er-

mittelt, an wievielen der 30 Auftragsstellen/Platte Kolonienwachstum zu beobachten war ($\hat{=}$ positive Tüpfel). Die Anzahl dieser Tüpfel pro Verdünnungsstufe wurde gezählt, ohne dabei die Anzahl der Kolonien pro Tüpfel zu berücksichtigen.

3.2.6. Statistische Auswertung

Die bei den verschiedenen Parametern erzielten Daten wurden aus den während des Versuchs geführten Listen auf Lochkarten übertragen und auf einer Telefunken-Anlage TR 440 verrechnet. Berechnet wurden geometrische (GKZ, EKZ, Psychrotrophe bzw. Coliforme) bzw. arithmetische (Pyruvat- bzw. L(+)-Laktatgehalt) Mittelwerte und deren Streuungen, Korrelationen sowie Häufigkeitsverteilungen. Die Mittelwerte wurden im t-Test darauf geprüft, ob ein signifikanter Unterschied vorlag, bei den Alkoholproben wurde der χ^2 -Test durchgeführt.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Alkoholstabilität

Die bei der Testung der von 25 Erzeugern stammenden 603 Anlieferungsmilchproben mit 77, 80 bzw. 83 Vol.-%igem Alkohol (jeweils "einfache" und "doppelte Alkoholprobe"; im weiteren wird die Probe mit der einfachen Alkoholmenge als "einfache Alkoholprobe", die Probe mit der doppelten Alkoholmenge als "doppelte Alkoholprobe" der obengenannten Alkoholkonzentrationen bezeichnet) erzielten Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Danach erwiesen sich

Tab. 2: Ausfall der "einfachen" bzw. "doppelten Alkoholprobe" bei 603 Anlieferungsmilchproben mit 77, 80 bzw. 83 Vol.-%igem Alkohol

Vol.-% des Alkohols	Anzahl (%) pos. Proben bei "einfacher" "doppelter" "Alkoholprobe"	
77	87 (14,4)	165 (27,4)
80	209 (34,7)	299 (49,6)
83	324 (53,7)	518 (85,9)

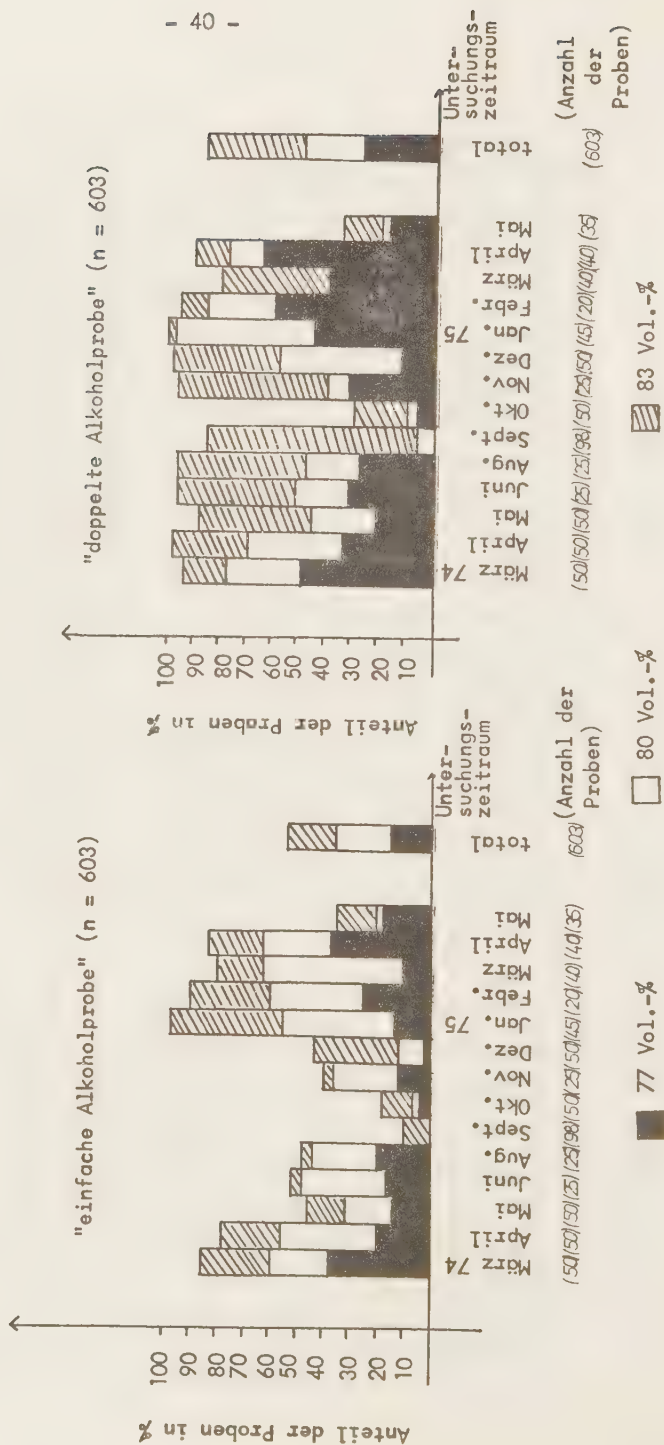
bei der "einfachen Alkoholprobe" noch 279 (46,3 %) der 603 Proben gegenüber dem 83 Vol.-%igem Alkohol stabil, bei der "doppelten Alkoholprobe" waren es bei der gleichen Alkoholkonzentration immerhin noch 85 (14,1 %). Demgegenüber reagierten 87 (14,4 %) Milchproben bereits bei der "einfachen Alkoholprobe" mit 77 Vol.-%igem Alkohol positiv. Zwischen der einmal täglich (11.10. mit 30.4.) und der zweimal täglich (1.5. mit 10.10.) erfolgenden Anlieferung bestanden hinsichtlich des Ausfalls der "einfachen Alkoholprobe" insofern deutliche Unterschiede, als der Anteil der gegenüber den verwendeten Alkoholkonzentrationen instabilen Proben bei der einmal täglichen Ablieferung mit 71,9 % gegenüber

29,5 % erheblich größer war (Tab. 3). Ebenso war der Anteil der durch Alkohol ausgefällten Proben im Winter (Januar mit März), aber auch Frühjahr (April mit Juni) deutlich größer als jener im Sommer (Juli mit September) und Herbst (Oktober mit Dezember). Bei der "doppelten Alkoholprobe" (Tab. 4) waren bei einer Einteilung der Proben entsprechend des Anlieferungsmodus ähnliche Tendenzen wie bei der "einfachen Alkoholprobe" zu beobachten, doch war die Differenz zwischen einmal (91,3 %) und zweimal (78,7 %) täglicher Ablieferung weitaus geringer. Hinsichtlich des Ausfalls der Probe mit doppelter Menge Alkohol in den verschiedenen Jahreszeiten zeigte sich, daß zwar auch im Winter der höchste Anteil der Proben positiv reagierte, jedoch im Sommer - in dem bei der "einfachen Alkoholprobe" am seltensten positive Resultate zu verzeichnen waren - häufiger Proben positiv zu beurteilen waren als im Frühjahr oder Herbst. Der überraschend hohe Anteil positiver Proben im Sommer ist offensichtlich darauf zurückzuführen, daß etwa drei Viertel aller Proben nach Zugabe der doppelten Menge 83 Vol.-%igen Alkohols geronnen waren.

In der die Tabellen 2 bis 4 ergänzenden Abb. 2 sind die Verhältnisse für die einzelnen Versuchsmonate aufgeführt. Hier ließ sich erneut feststellen, daß der Ausfall der Alkoholprobe jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen war. Beim statistischen Vergleich der Ergebnisse im χ^2 -Test zeigten sich bei der "einfachen Alkoholprobe" hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede zwischen einmal und zweimal täglicher Anlieferung sowie zwischen den Jahreszeiten. Bei der "doppelten Alkoholprobe" wurden die gleichen Verhältnisse registriert.

Abb. 2: Prozentuale Häufigkeiten positiver Reaktionen bei der Alkoholprobe

(77, 80, 83 Vol.-%) mit einfacher und doppelter Menge Alkohol



3.3.2. Gesamtkeimzahl

Das geometrische Mittel der mit dem Koch'schen Plattenverfahren bei den 603 Anlieferungsmilchproben ermittelten Gesamtkeimzahlen (GKZ) lag bei 334.000/ml (Tab. 5).

Tab. 5: Keimgehalt (GKZ) von 603 Anlieferungsmilchproben

Anzahl der Proben	Keimzahl in 1.000 /ml	
	$\bar{x}_g$	Extremwerte
603 (total)	334	1 - 50.000
345 (1 x tgl.)	352	1 - 28.000
258 (2 x tgl.)	310	3 - 50.000
155 (Winter)	269	1 - 28.000
200 (Frühjahr)	300	1 - 48.000
99 (Sommer)	418	3 - 23.000
149 (Herbst)	413	3 - 50.000

Die Mittelwerte für die täglich einmal (345) und täglich zweimal (258) angelieferten Milchproben unterschieden sich dabei mit 352.000 Keimen/ml und 310.000 Keimen/ml nur geringfügig. Eine Beziehung zwischen Gesamtkeimzahl und Jahreszeit deutete sich insofern an, als der durchschnittliche Keimgehalt im Sommer mit 418.000 Keimen/ml und im Herbst mit 413.000 Keimen/ml deutlich höher war als im Winter mit 269.000 Keimen/ml und im Frühjahr mit 300.000 Keimen/ml. Bei Durchführung des t-Testes ergaben sich jedoch keine Hinweise dafür, daß die Unterschiede

zwischen den Mittelwerten signifikant sind. Die Extremwerte für den Gesamtkeimgehalt lagen bei 50.000.000 Keimen/ml einerseits und 1.000 Keimen/ml andererseits. In Abb. 3 sind die prozentualen Häufigkeiten von Proben in verschiedenen Keimzahlbereichen wiedergegeben. Hieraus geht u.a. hervor, daß mit Ausnahme von Oktober 1974 und April 1975 mindestens 40 % der Proben weniger als 250.000 Keime/ml aufwiesen (insgesamt waren es 45 %). Keimzahlen von über 10^7 /ml wurden nur bei 5,6 % der 603 Proben registriert, im Juni und August 1974 waren derartige Proben im Untersuchungsmaterial nicht zu finden.

Im Rahmen anderer Versuche wurden in den Monaten März, April, Mai, Oktober und Dezember 1974 von 603 Proben 149 auch der elektronischen Mikrokoloniezählung unterworfen. Der geometrische Mittelwert der Keimzahlen (EKZ) dieser Proben wurde mit 62.000 /ml errechnet, der höchste registrierte Einzelwert lag bei 3.650.000 /ml, das Minimum bei 1.000 /ml (die vergleichbaren Extremwerte der GKZ lauteten 30.000.000 /ml bzw. 4.000 /ml). In ihrer Tendenz waren bei den für ein- und zweimalige Anlieferung/Tag bzw. für die verschiedenen Jahreszeiten gesondert ermittelten geometrischen Mittelwerten und Extremwerten der EKZ ähnliche Verhältnisse wie bei der GKZ gegeben, doch wurde aufgrund der geringen Probenzahl und der infolgedessen verminderten Aussagekraft auf eine tabellarische Wiedergabe verzichtet. Hinsichtlich der Häufigkeit einzelner Keimzahlbereiche zeigte sich, daß 85,9 % der 149 Proben weniger als 250.000 Keime/ml aufwiesen und nur bei 3,4 % Werte von über 1.000.000 Keime/ml zu registrieren waren (Abb. 4). Die zum Vergleich in Abb. 4 ebenfalls darge-

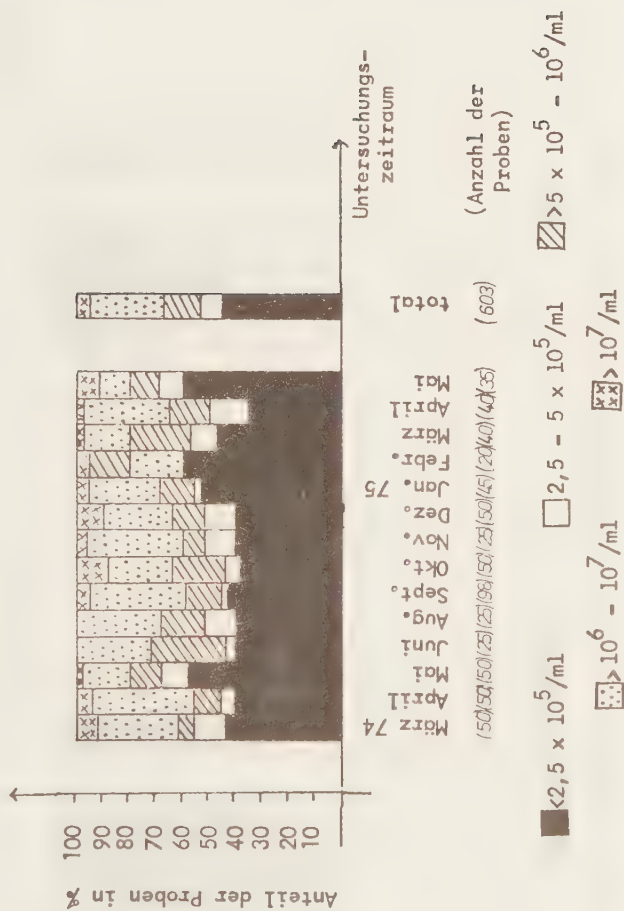
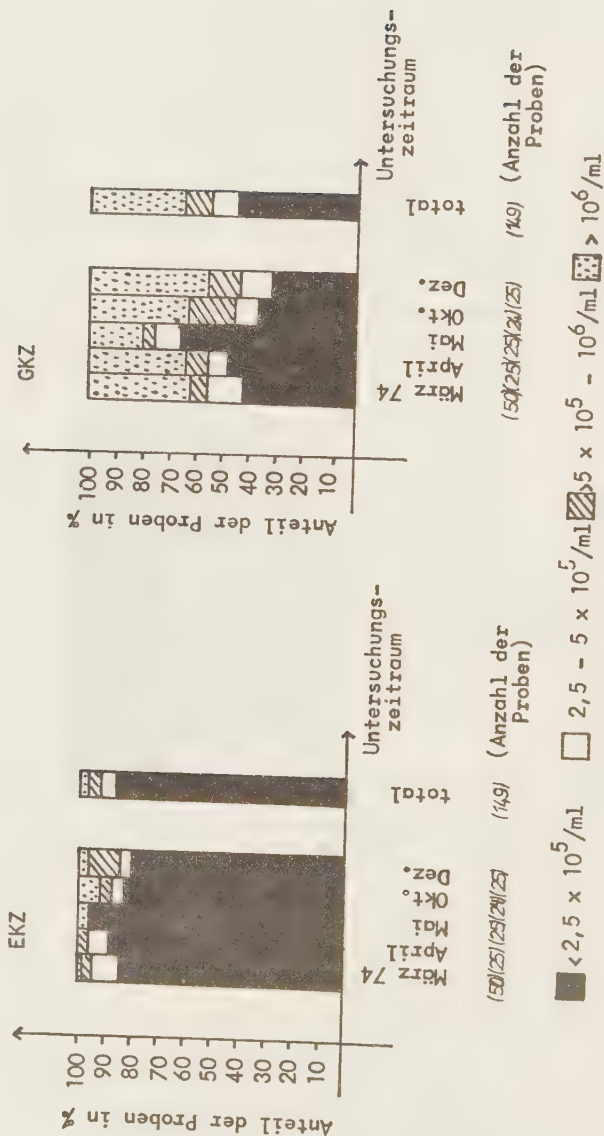


Abb. 4: Prozentuale Häufigkeiten verschiedener Keimzahlbereiche (EKZ und GKZ) bei 149 Anlieferungsmilchproben



stellten Verhältnisse für die im Koch'schen Plattenverfahren bestimmte Gesamtkeimzahl (GKZ) gleichen in ihrer Tendenz derjenigen der EKZ, unterscheiden sich aber davon durch die andere prozentuale Aufteilung auf die verschiedenen Keimzahlbereiche (z.B. nur 45,0 % der 149 Proben weniger als 250.000 Keime/ml).

Erwartungsgemäß besteht zwischen den Ergebnissen der GKZ und EKZ eine enge Beziehung; die Verrechnung der Werte von 149 Proben ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = + 0,75$.

3.3.3. Pyruvat- und L(+)-Laktatgehalt

Bei den 149 Proben, bei denen die elektronische Mikrokoloniezählung durchgeführt wurde, wurde auch der Gehalt an Pyruvat und L(+)-Laktat bestimmt. Dabei wurden die in Tab. 6 wiedergegebenen Ergebnisse registriert. Auffällig war, daß der durchschnittliche Pyruvatgehalt bei ein- bzw. zweimal täglicher Anlieferung wie auch während der verschiedenen Jahreszeiten nur geringfügig

Tab. 6: Pyruvat- und L(+)-Laktatgehalt in
149 Anlieferungsmilchproben

Parameter	Gehalt in ppm	
	$\bar{x}$	Extremwerte
Pyruvat	1,3	0,3 - 17,0
L(+)-Laktat*	31	3 - 176

* Es standen nur die Ergebnisse von
143 Proben zur Verfügung.

Abb. 5a: Prozentuale Häufigkeiten verschiedener Pyruvatgehalt-Bereiche bei 149 Anlieferungs-milchproben

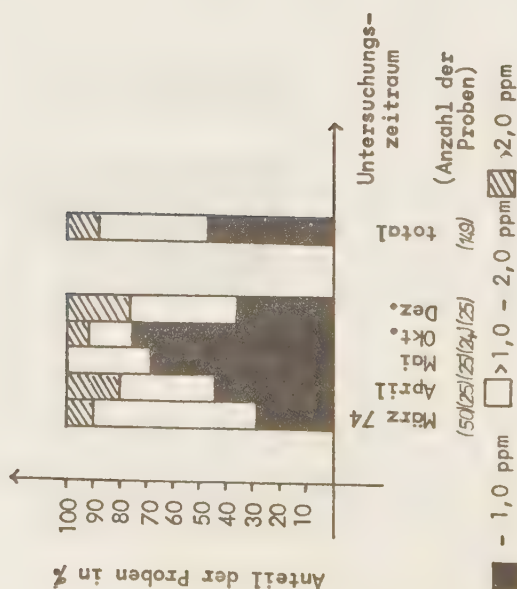
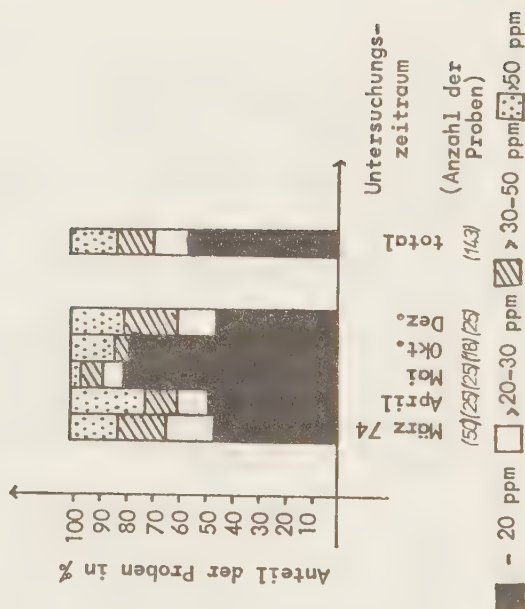


Abb. 5b: Prozentuale Häufigkeiten verschiedener L(+)-Laktatgehalt-Bereiche bei 143 Anlieferungs-milchproben



differierte, während beim L(+)-Laktatgehalt größere Unterschiede errechnet wurden (z.B. 35 ppm bei einmal täglicher Anlieferung - 22 ppm bei zweimal täglicher Anlieferung). Aufgrund der insgesamt relativ geringen Probenzahl sind diese Tendenzen jedoch mit gewisser Zurückhaltung zu bewerten. Bei einer Einteilung der Proben in willkürlich gewählte Klassen zeigte sich, daß 46,3 % aller Proben bis zu 1 ppm Pyruvat enthielten, und bei 12,1 % mehr als 2 ppm nachweisbar waren (Abb. 5a). Dabei bestanden zum Teil erhebliche monatliche Unterschiede. Mit 56 % war der Prozentsatz der Proben mit bis zu 20 ppm L(+)-Laktat sehr hoch (Abb. 5b); nur 17,5 % der untersuchten Proben lagen im Bereich von mehr als 65 ppm. Ähnlich wie beim Pyruvatgehalt waren auch beim L(+)-Laktatgehalt besonders im Mai und Oktober viele Proben vorhanden, die nur geringe Mengen dieser Stoffwechselprodukte aufwiesen.

Bei der Gegenüberstellung der Pyruvat-Werte einerseits und der Ergebnisse der anderen Keimgehaltsbestimmungsverfahren andererseits ergaben sich folgende positive Korrelationskoeffizienten r : 0,75 (GKZ), 0,71 (EKZ), 0,62 (Psychrotrophe) bzw. 0,43 (Coliforme - Standard-Routinemethode). Bei den L(+)-Laktatgehalten wurden folgende positive Korrelationskoeffizienten errechnet: 0,66 (GKZ), 0,52 (EKZ), 0,34 (Psychrotrophe) bzw. 0,22 (Coliforme - Standard-Routinemethode). Zwischen L(+)-Laktat- und Pyruvatgehalt bestand ebenfalls eine Beziehung ($r = + 0,55$).

3.3.4. Psychrotrophe Keime

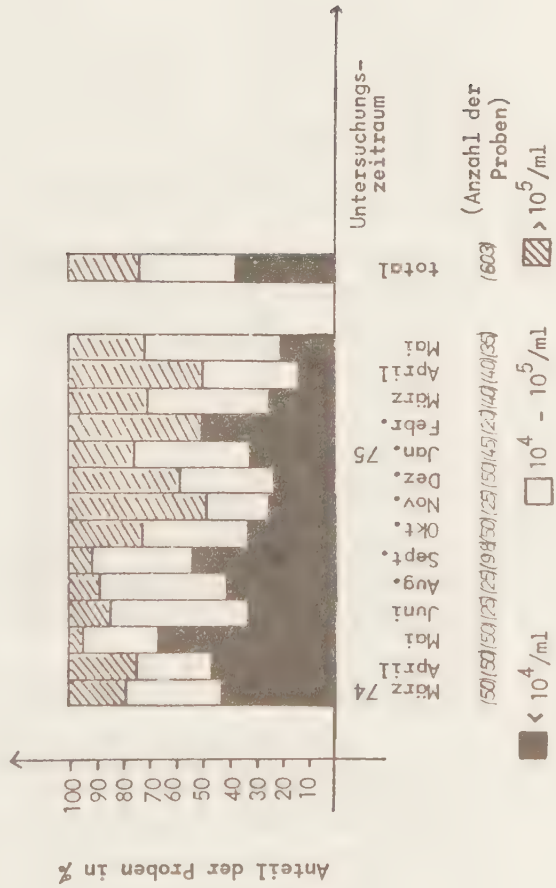
Das geometrische Mittel für die psychrotrophen Keime belief sich in den getesteten 603 Proben auf 22.000 /ml (Höchstwert: 10.000.000 /ml). Die Berechnung der geometrischen Mittelwerte entsprechend dem Anlieferungsmodus bzw. der Jahreszeit der Anlieferung erbrachte, daß einerseits die einmal täglich angelieferte Milch mehr Psychrotrophe (38.000 /ml) aufwies als die zweimal täglich angelieferte (10.000 /ml) und daß andererseits der Gehalt an diesen Keimen im Sommer sehr gering (8.000 /ml), im Herbst aber (45.000 /ml) doppelt so hoch wie im Gesamtdurchschnitt war (Tab. 7). Bei Durchführung des t-Testes ergab sich,

Tab. 7: Gehalt psychrotropher Keime in 603 Anlieferungsmilchproben

Anzahl der Proben	Keimzahl in 1.000 /ml	
	$\bar{x}_g$	Extremwerte
603 (total)	22	0,4 - 10.000
345 (1 x tgl.)	38	0,1 - 10.000
258 (2 x tgl.)	10	0,1 - 6.000
155 (Winter)	25	0,1 - 10.000
200 (Frühjahr)	19	0,1 - 6.000
99 (Sommer)	8	0,1 - 3.500
149 (Herbst)	45	0,4 - 3.000

daß sich die Mittelwerte für die einmal bzw. zweimal täglich angelieferten Milchproben hochsignifikant ($p < 0,01$) unterschieden. Gleiches galt für Mittelwerte, die für im Winter und Sommer angelieferte Milch erzielt wurden,

Abb. 6: Prozentuale Häufigkeiten verschiedener Keimzahlbereiche psychrotropher Keime bei 603 Anlieferungsmilchproben



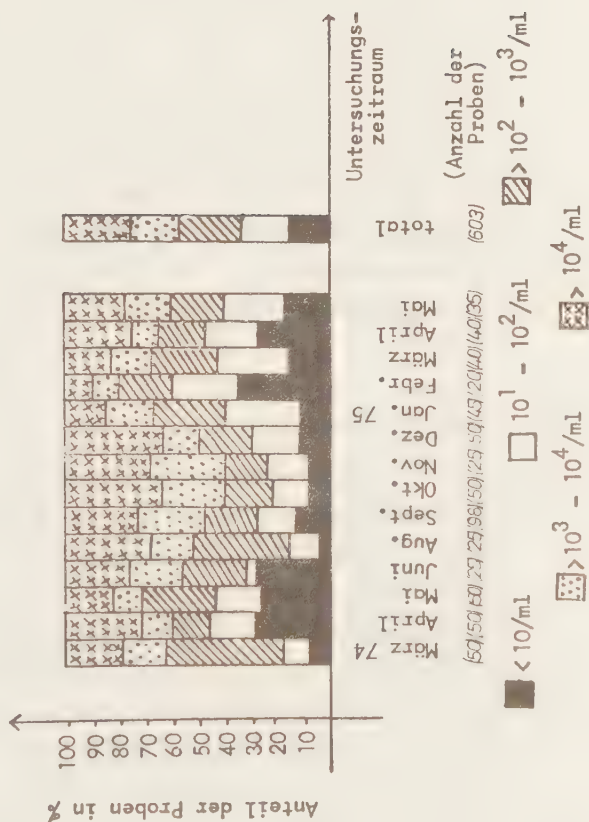
während sich die anderen Mittelwerte - mit Ausnahme jener vom Winter und Frühjahr - jeweils signifikant ($p < 0,05$) unterschieden. Der Anteil der Proben mit weniger als 10.000 Psychrotrophen/ml betrug bei den insgesamt 603 Proben 37,3 % (Abb. 6). Dabei zeigten sich teilweise recht erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Monaten (Mai 1974: 66 % - April 1975: 12,5 %). Im November 1974 sowie Februar und April 1975 waren in mindestens 50 % der untersuchten Proben mehr als 100.000 Psychrotrophe/ml, während sich der Anteil dieser Proben über den gesamten Beobachtungszeitraum nur auf 24,1 % belief. Bei der Verrechnung der bei der Bestimmung der Psychrotrophen erzielten Ergebnisse mit der Gesamtkeimzahl ergaben sich Korrelationskoeffizienten von $r = + 0,65$ (GKZ; $n = 603$) bzw. von $r = + 0,60$ (EKZ; $n = 149$).

3.3.5. Coliforme Keime

3.3.5.1. Standard-Routinemethode

Der geometrische Mittelwert für die mit dem vom INTERNATIONALEN MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND (1966) empfohlenen Neutralrot-Galle-Laktose-Agar ermittelten coliformen Keime betrug 720 /ml. Im Gegensatz zu den anderen geprüften mikrobiologischen Kriterien (GKZ, EKZ, Psychrotrophe) war das geometrische Mittel bei der einmaligen Anlieferung (690 /ml) nicht höher als bei der zweimaligen (750 /ml), während hinsichtlich der Jahreszeiten eine ähnliche Tendenz wie bei der GKZ (Sommer - 1.190 /ml und Herbst - 1.550 /ml; höhere Keimgehalte als im Winter - 480 /ml und Frühjahr - 430 /ml) zu registrieren war. Statistisch gesichert waren die Unter-

Abbs. 7: Prozentuale Häufigkeiten verschiedener Keimzahlbereiche coliformer Keime bei 603 Anlieferungsmilchproben



schiede in den Mittelwerten vom Winter und Herbst bzw. Frühjahr und Sommer ($p < 0,01$) sowie Winter und Sommer bzw. Frühjahr und Herbst ($p < 0,05$). Der Anteil der Proben mit weniger als 10 coliformen Keimen/ml lag für die 603 Proben bei 16,4 % (Abb. 7), schwankte in den einzelnen Monaten jedoch erheblich (Variationsbreite: 4 % - 35 %). Auch für die anderen Keimgehaltsbereiche ergaben sich recht unterschiedliche Prozentsätze. Zwischen der Anzahl Coliformer und der Anzahl Psychrotropher bestand eine etwas engere Beziehung ($r = + 0,67$) als zwischen der Anzahl Coliformer und der Gesamtkeimzahl ($r = + 0,65$ bei der GKZ bzw. $r = + 0,40$ bei der EKZ mit nur 149 Proben).

3.3.5.2. Stempelverfahren

Die Anzahl Koloniewachstum zeigender ($\hat{=}$ positiver) Tüpfel kann bei dem verwendeten, aus 30 Einzelelementen bestehenden Stempel zwischen 0 und 30 pro untersuchter Verdünnungsstufe betragen. Da jeweils drei Verdünnungsstufen (10^{-1} bis einschließlich 10^{-3}) getestet wurden, wurden die Ergebnisse der drei Verdünnungsstufen im Hinblick auf eine sinnvolle Auswertung zu einem Wert zusammengefaßt, so daß sich Zahlen zwischen 0 und 90 positiven Tüpfeln ergaben. Der Tab. 8 ist zu entnehmen, daß bei 191 (33,9 %) der mit dem Stempel angesetzten 563 Proben kein Keimwachstum zu beobachten war (bei 6 Proben waren im übrigen alle 90 Tüpfel positiv). Da der Anteil der Proben mit 1 bis 10 positiven Tüpfeln 30 % ausmachte, waren nur bei ca. einem Drittel (36,1 %) aller

Tab. 8: Häufigkeiten positiver Tüpfel aller drei Verdünnungsstufen bei 563 Anlieferungsmilchproben

Anzahl positiver Tüpfel	Anzahl (%) der Proben
0	191 (33,9)
1 - 10	169 (30,0)
11 - 20	46 (8,2)
21 - 30	35 (6,2)
31 - 40	24 (4,3)
41 - 50	19 (3,4)
51 - 60	22 (3,9)
61 - 70	21 (3,7)
71 - 80	17 (3,0)
81 - 90	19 (3,4)

Proben mehr als 10 der 90 möglichen Tüpfel positiv. Bei den Proben mit insgesamt mehr als 40 positiven Tüpfeln zeigten bis auf wenige Ausnahmen alle 30 Tüpfel der Verdünnung 10^{-1} Wachstum, bei Proben mit insgesamt mehr als 70 Tüpfeln traf dies außerdem auf die Verdünnung 10^{-2} zu. Bei einer Auswertung der Ergebnisse entsprechend der jeweiligen Verdünnungsstufe ergaben sich die in Tab. 9 aufgeführten Verteilungen. Daraus wird z.B. ersichtlich, daß bei über 50 % der untersuchten Proben der Verdünnung 10^{-2} kein Koloniewachstum zeigender Tüpfel mehr registriert wurde.

Bei einer Unterteilung der Proben entsprechend der Jahreszeit der Anlieferung stellte sich - wie zuvor bei der Standard-Routinemethode - heraus, daß die Proben des

Tab. 9: Häufigkeiten positiver Tüpfel einzelner Verdünnungsstufen bei 563 Anlieferungsmilchproben

Anzahl pos. Tüpfel	Anzahl der Proben (%) in der Verdünnung		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
0	212 (37,6)	299 (53,1)	400 (71,0)
1 - 10	171 (30,4)	154 (27,4)	126 (22,4)
11 - 20	55 (9,8)	38 (6,7)	19 (3,4)
21 - 30	125 (22,2)	72 (12,8)	18 (3,2)
insgesamt	563 (100,0)	563 (100,0)	563 (100,0)

Sommers und Herbsts keimhaltiger waren als jene im Winter und Frühling. Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse des Standard-Routineverfahrens und des Stempelverfahrens (alle Verdünnungsstufen) wurde ein Korrelationskoeffizient von $r = + 0,88$ errechnet, bei Berücksichtigung jeweils nur einer Verdünnungsstufe waren die Korrelationskoeffizienten niedriger ($r = + 0,87$ bei 10^{-3} ; $r = + 0,74$ bei 10^{-2} bzw. $r = + 0,58$ bei 10^{-1}).

3.3.6. Beziehungen zwischen Alkoholstabilität und den anderen geprüften Parametern

Im Hinblick auf eine Aussage zur Eignung der Alkoholprobe als Schnellverfahren zur Ermittlung der hygienischen Qualität von Rohmilch wurden zuerst für die verschiedenen Parameter die Mittelwerte berechnet, bei denen die "ein-

fache" bzw. "doppelte Alkoholprobe" mit 77, 80 bzw. 83 Vol.-%igem Alkohol positiv ausgefallen war. Bei der "einfachen Alkoholprobe" (Tab. 10) ließ sich beobachten, daß die Mittelwerte - abgesehen von denen der coliformen Keime - mit steigender Alkoholkonzentration abnahmen. Bei der "doppelten Alkoholprobe" (Tab. 11) wurden die Mittelwerte demgegenüber nur bei der EKZ stets geringer; bei den anderen Parametern waren die Mittelwerte der mit 83 Vol.-%igem Alkohol ausgefällten Milchproben jedoch entweder gleichgroß (Pyruvat) oder sogar größer (GKZ, Psychrotrophe, Coliforme, L(+)-Laktat) als jene der bereits mit 80 Vol.-%igem Alkohol ausflockenden Milchproben. Dies war in erster Linie dadurch bedingt, daß in den Monaten August mit Dezember 1974 relativ viele Proben trotz hoher Keimzahlen bzw. hoher Gehalte an L(+)-Laktat oder Pyruvat erst bei der Probe mit doppelter Menge 83 Vol.-%igen Alkohols Gerinnung zeigten.

Die Mittelwerte für die verschiedenen Alkoholstufen differierten allerdings häufig nicht sehr stark. Die Verrechnung der Ergebnisse erbrachte, daß zumeist nur die Mittelwerte der mit 77 Vol.-%igem Alkohol ausgefallenen Milchproben signifikant von denen der bei 80 bzw. 83 Vol.-% geronnenen oder gegenüber 83 Vol.-% stabilen Milchproben abwichen (Tab. 12). Zwischen den Mittelwerten der mit 80 bzw. 83 Vol.-%igem Alkohol präzipitierten Proben ("einfache Alkoholprobe") bestanden in keinem Falle statistisch gesicherte Unterschiede, zwischen den Mittelwerten der gegenüber 83 Vol.-%igem Alkohol empfindlichen bzw. stabilen Milch-

Tab. 10: Vergleich von Empfindlichkeit der Milch gegenüber Alkohol ("einfache Alkoholprobe") und den entsprechenden Mittelwerten anderer Parameter

Ausflockung bei Alkohol- Vol.-% (Anzahl der Proben)	GKZ/ml $\bar{x}_g$	EKZ*/ml $\bar{x}_g$ (n)	Psychro- trophe/ml $\bar{x}_g$	Coliforme /ml $\bar{x}_g$	Pyruvat (ppm) $\bar{x}$ (n)	L(+)-Laktat* (ppm) $\bar{x}$ (n)
77 (87)	995.000	133.000 (29)	89.000	2.450	2,2 (29)	52 (29)
80 (122)	360.000	69.000 (30)	26.000	551	1,3 (30)	32 (30)
83 (115)	269.000	48.000 (35)	22.000	534	1,2 (35)	29 (34)
> 83 (279)	250.000	45.000 (55)	12.000	616	0,9 (55)	18 (50)

Zeichenerklärung: * bei EKZ und Pyruvat bzw. L(+)-Laktat wurden insgesamt nur 149 bzw. 143 Proben untersucht

Tab. 11: Vergleich von Empfindlichkeit der Milch gegenüber Alkohol ("doppelte Alkoholprobe") und den entsprechenden Mittelwerten anderer Parameter

Ausflockung bei Alkohol- Vol.-% (Anzahl der Proben)	GKZ/ml $\bar{x}_g$	EKZ*/ml $\bar{x}_g$	Psychro- trophe/ml $\bar{x}_g$	Coliforme /ml $\bar{x}_g$	Pyruvat (ppm) $\bar{x}$	L(+)-Laktat* (ppm) $\bar{x}$
77 (165)	698.000	102.000 (46)	56.000	1.209	1,9 (46)	44 (46)
80 (134)	209.000	56.000 (39)	16.000	422	1,1 (39)	25 (38)
83 (219)	414.000	49.000 (43)	18.000	865	1,1 (43)	26 (43)
>83 (85)	95.000	42.000 (21)	8.000	365	0,7 (21)	14 (16)

Zeichenerklärung: * bei EKZ und Pyruvat bzw. L(+)-Laktat wurden insgesamt nur 149 bzw. 143 Proben untersucht

Tab. 12: Signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der
geprüften Parameter bei der "einfachen" bzw. "dop-
pelten Alkoholprobe"

Parameter	"Einfache Alkoholprobe"	"Doppelte Alkoholprobe"
	signifikante Differenzen zwischen Mittelwerten bei den Alkoholkonzentrationen (Vol.-%)	
GKZ	77 - 80 ** - 83 ** - >83 **	77 - 80 ** - 83 * - >83 ** 80 - 83 ** - >83 ** 83 - >83 **
EKZ	77 - 83 ** - >83 **	77 - 83 ** - >83 *
Psychro- trophe	77 - 80 ** - 83 ** - >83 ** 80 - >83 ** 83 - >83 *	77 - 80 ** - 83 ** - >83 ** 80 - >83 * 83 - >83 *
Coliforme	77 - 80 ** - 83 ** - >83 **	77 - 80 ** - 83 * 80 - 83 * 83 - >83 *
Pyruvat	77 - 83 * - >83 ** 80 - >83 ** 83 - >83 *	77 - 83 * - >83 * 80 - >83 ** 83 - >83 **
L(+)-Laktat	77 - 83 * - >83 ** 80 - >83 *	77 - 80 * - 83 * - >83 *

Tab. 13: Empfindlichkeit der Milch gegenüber Alkohol und dazugehörige Extremwerte anderer Parameter bei "einfacher" bzw. "doppelter Alkoholprobe"

Ausflockung bei Alkohol- Vol.-%	GKZ in 10 ³ /ml	EKZ in 10 ³ /ml	Psychrotrophe in 10 ³ /ml	Coliforme in 10 ³ /ml	Pyruvat ppm	L(+)-Laktat ppm
77 *	3 - 48.000	1 - 3.650	0,1 - 10.000	< 0,01 - 2.630	0,3 - 17,0	6 - 176
80 *	1 - 13.100	20 - 1.224	0,1 - 3.520	< 0,01 - 2.000	0,4 - 2,7	6 - 174
83 *	9 - 27.000	1 - 526	0,1 - 3.000	< 0,01 - 340	0,3 - 3,0	4 - 170
>83 *	3 - 26.000	14 - 1.494	0,1 - 3.500	< 0,01 - 1.125	0,3 - 2,6	2 - 95
77 **	3 - 48.000	1 - 2.048	0,1 - 10.000	< 0,01 - 2.630	0,3 - 17,0	6 - 176
80 **	1 - 13.000	1 - 1.224	0,1 - 2.000	< 0,01 - 860	0,4 - 2,7	4 - 95
83 **	4 - 27.000	1 - 3.000	0,1 - 3.500	< 0,01 - 630	0,3 - 3,0	3 - 170
>83 **	3 - 9.000	14 - 1.494	0,1 - 2.600	< 0,01 - 320	0,4 - 1,7	2 - 51

Zeichenerklärung: * "einfache Alkoholprobe"

** "doppelte Alkoholprobe"

proben nur bei Psychrotrophen und Pyruvat ($p < 0,05$). Bei der Probe mit doppeltem Alkoholvolumen waren die Verhältnisse ähnlich wie bei der "einfachen Alkoholprobe"; die die Proben mit 83 Vol.-%igem Alkohol betreffenden Fälle sind jedoch mit Zurückhaltung zu bewerten, da die Mittelwerte beim 83 Vol.-%igen Alkohol - wie bereits erwähnt - größer waren als beim 80 Vol.-%igen Alkohol (Ausnahme: EKZ und Pyruvat).

Auch die Extremwerte (Tab. 13) der gegenüber 80 bzw. 83 Vol.-%igem Alkohol empfindlichen und gegen 83 Vol.-%igem Alkohol stabilen Milchproben differierten nur unerheblich, während die Maxima der mit 77 Vol.-%igem Alkohol geronnenen Milchproben mit Ausnahme des L(+)-Laktatgehaltes ("einfache Alkoholprobe") bzw. des L(+)-Laktatgehaltes und der EKZ ("doppelte Alkoholprobe") deutlich größer waren als jene der anderen Alkoholkonzentrationen.

Zur besseren Veranschaulichung werden in den Abbildungen 8 bis 13 die einfachen, die 1 1/2-fachen und 2-fachen Standardabweichungen und das geometrische Mittel der Keimzahlen bzw. das arithmetische Mittel der Pyruvat- und L(+)-Laktatgehalte in Abhängigkeit von dem Verhalten der Milchproben gegenüber den geprüften Alkoholkonzentrationen ("einfache" und "doppelte Alkoholprobe") wiedergegeben: Aus Abb. 8 (GKZ) wird z.B. ersichtlich, daß die geometrischen Mittelwerte bei der "einfachen Alkoholprobe" mit Ausnahme desjenigen bei 77 Vol.-% relativ dicht beieinanderliegen (siehe auch Tab. 10) und daß im Bereich der zweifachen Standardabweichung

Abb. 8: Mittelwerte und Streuungen der Gesamtkeimzahl (GKZ) bei 603 Anlieferungsmilchproben unter Berücksichtigung des Ausfalls einer verschärften Probe mit einfacher bzw. doppelter Menge 77, 80 bzw. 83 Vol.-%igen Alkohols

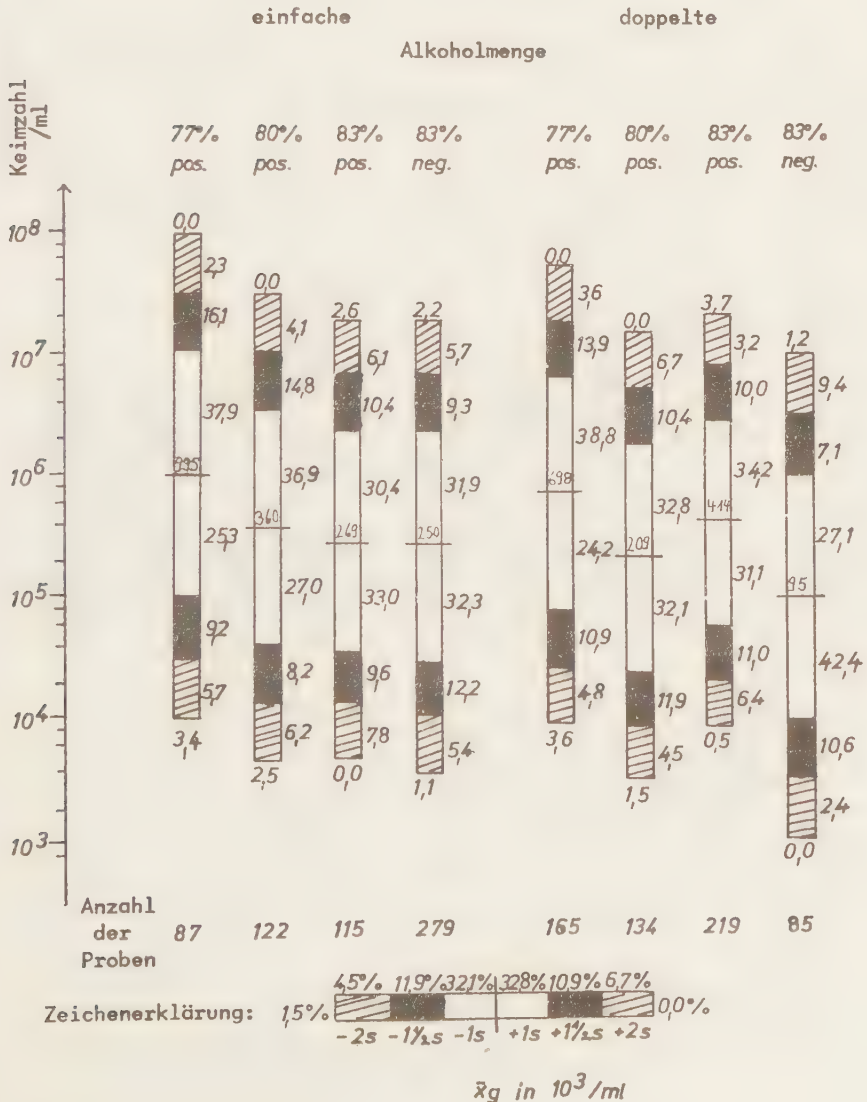
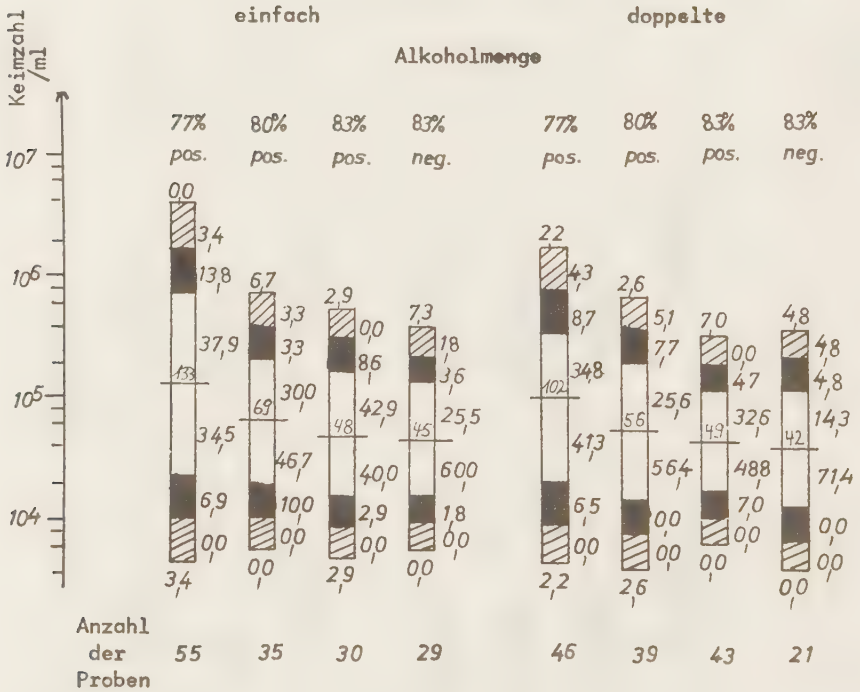
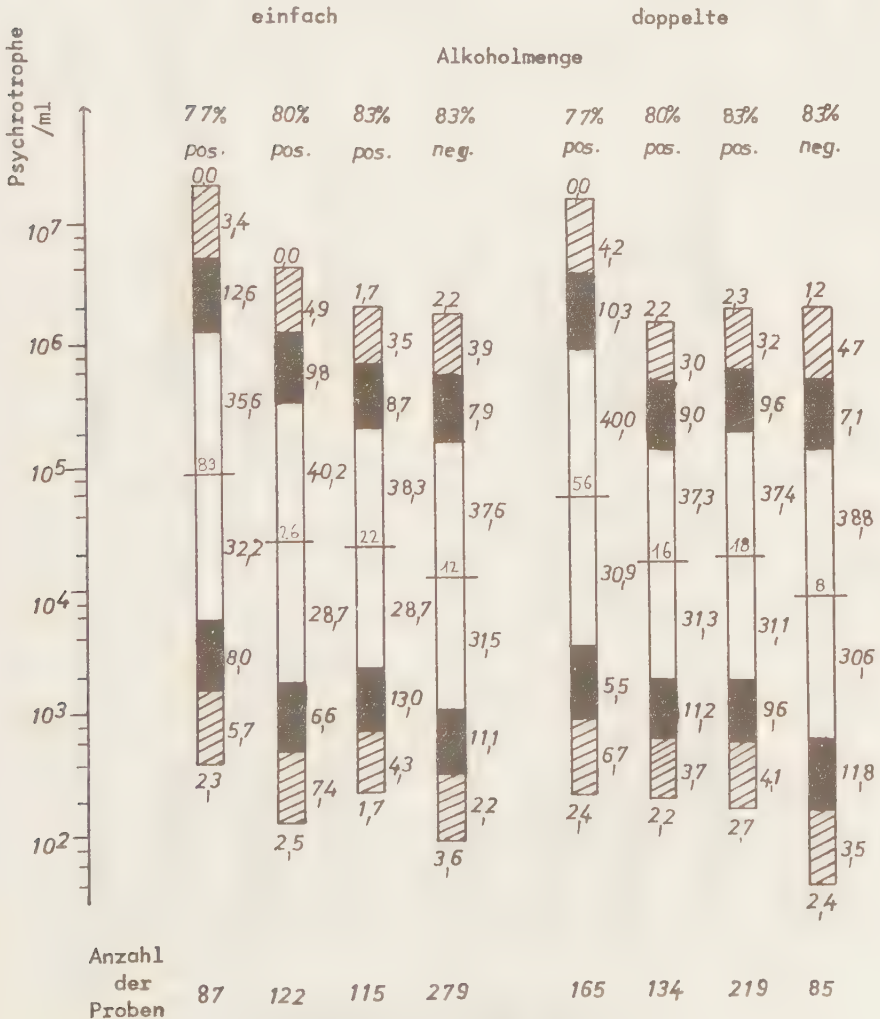


Abb. 9: Mittelwerte und Streuungen der Gesamtkeimzahl (EKZ) bei 149 Anlieferungsmilchproben unter Berücksichtigung des Ausfalls einer verschärften Probe mit einfacher bzw. doppelter Menge 77, 80 bzw. 83 Vol.-%igen Alkohols



Zeichenerklärung: siehe Abb. 8

Abb. 10: Mittelwerte und Streuungen der Psychrotrophen bei 603 Anlieferungs Milchproben unter Berücksichtigung des Ausfalls einer verschärften Probe mit einfacher bzw. doppelter Menge 77, 80 bzw. 83 Vol.-%igen Alkohols



Zeichenerklärung: siehe Abb. 8

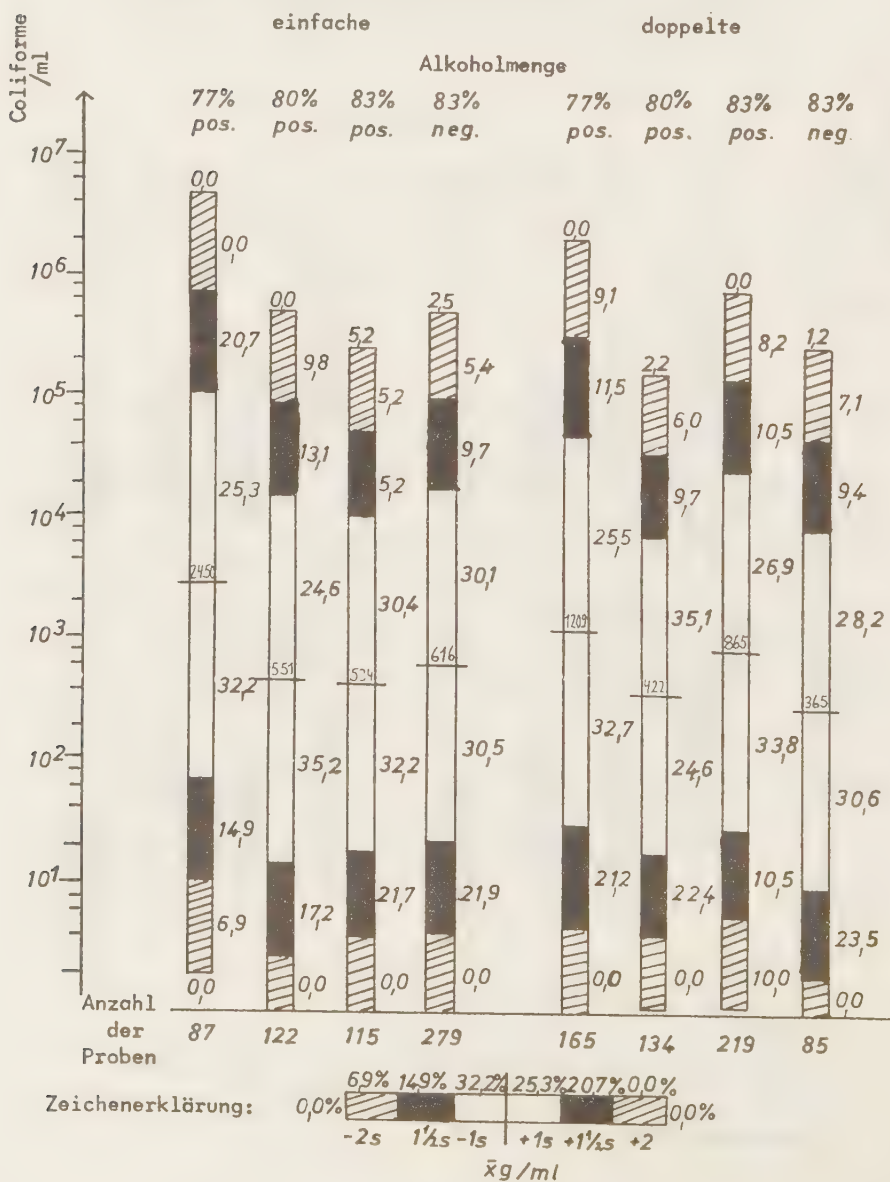


Abb. 12: Mittelwerte und Streuungen der Pyruvatwerte bei 149 Anlieferungsmilchproben unter Berücksichtigung des Ausfalls einer verschärften Probe mit einfacher bzw. doppelter Menge 77, 80 bzw. 83 Vol.-%igen Alkohols

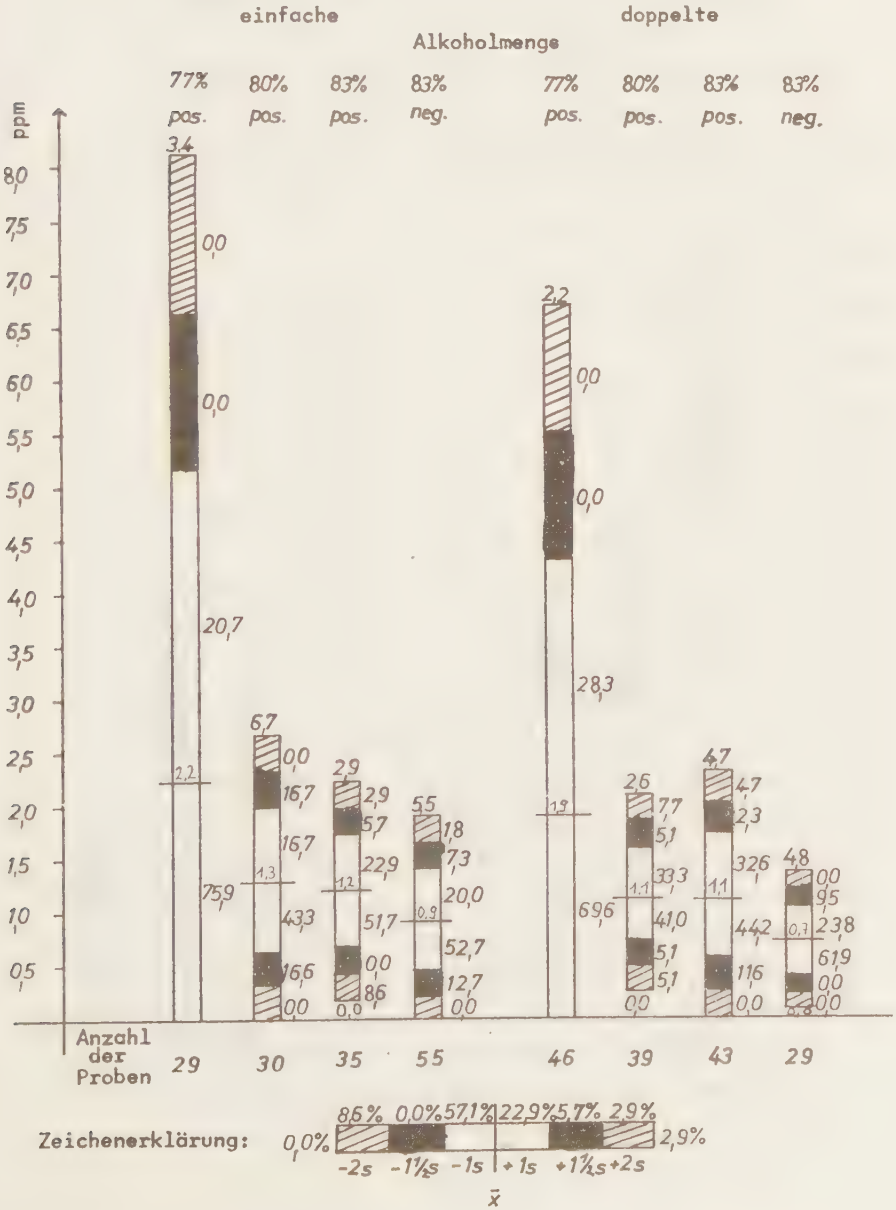
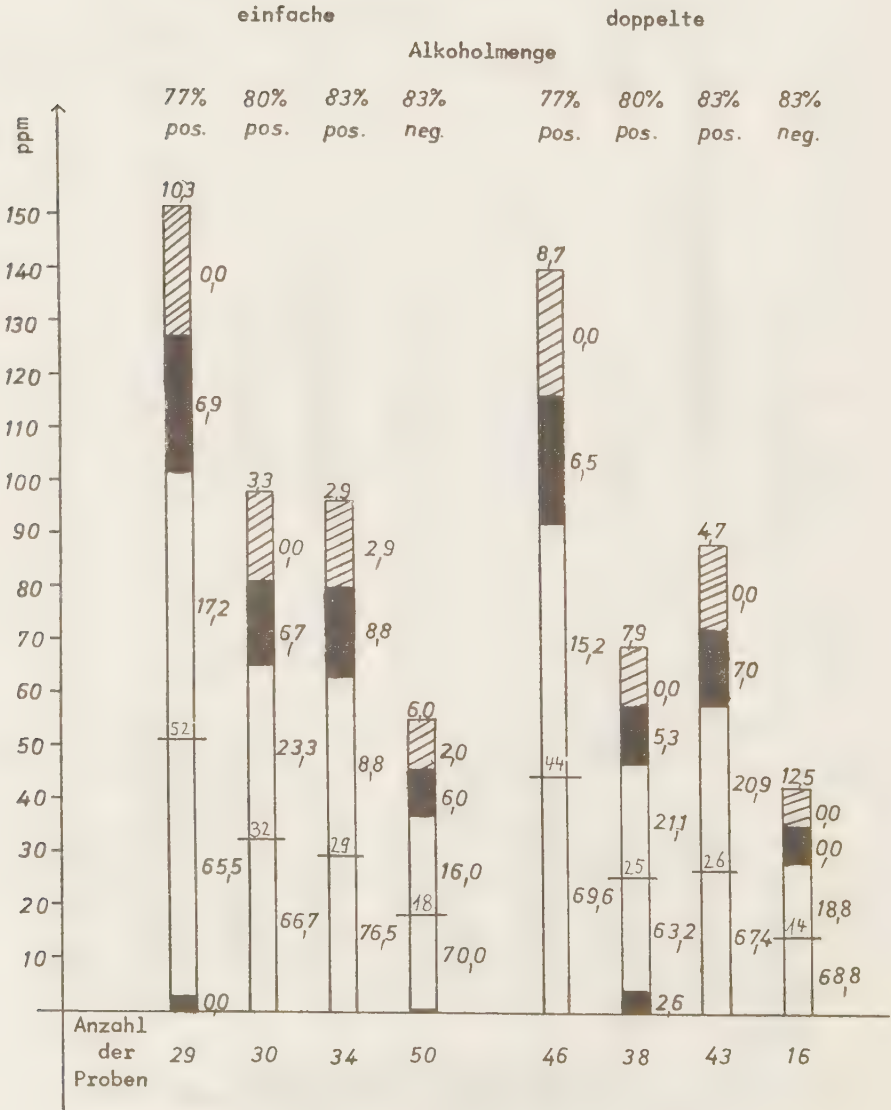


Abb. 13: Mittelwerte und Streuungen der L(+)-Laktatwerte bei 143 Anlieferungsmilchproben unter Berücksichtigung des Ausfalls einer verschärften Probe mit einfacher bzw. doppelter Menge 77, 80 bzw. 83 Vol.-%igen Alkohols



nur bei der letztgenannten Alkoholkonzentration Keimzahlen über 3×10^7 /ml registriert wurden (siehe auch Tab. 13). Abweichend von den Verhältnissen bei der "einfachen Alkoholprobe" war der Mittelwert für die GKZ bei der Probe mit doppelter Menge 83 Vol.-%igen Alkohols höher als der mit 80 Vol.-%igem Alkohol (siehe auch Tab. 11), so daß keine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen Mittelwert der GKZ und Alkoholkonzentration gegeben war. Diese Abbildung enthält zusätzlich zu diesen bereits bekannten Informationen jedoch auch Hinweise darüber, daß 63,2 % der gegenüber 77 Vol.-%igem Alkohol positiven Milchproben ("einfache Alkoholprobe") im Bereich der einfachen Standardabweichung (ca. 9×10^4 bis ca. 10^7 Keime/ml) lagen, insgesamt 88,5 % (63,2 % plus 25,3 %) im Bereich der 1 1/2-fachen Standardabweichung (ca. 3×10^4 bis ca. 4×10^7 Keime/ml) und schließlich insgesamt 96,5 % (88,5 % plus 8 %) im Bereich der zweifachen Standardabweichung (10^4 bis ca. 9×10^7 Keime/ml); 3,4 % der Proben wichen um mehr als - 2s vom geometrischen Mittelwert ab. Die Streuungen um die Mittelwerte der gegenüber 80 bzw. 83 Vol.-%igem Alkohol positiven sowie gegenüber 83 Vol.-%igem Alkohol negativen Proben unterschieden sich untereinander nur geringfügig. Die Keimzahlen reichten bei Berücksichtigung der einfachen Standardabweichung von ca. 4×10^4 bis ca. 4×10^6 /ml (80 Vol.-%), von ca. 3×10^4 bis 2×10^6 /ml (83 Vol.-% positiv) bzw. von ca. 3×10^4 bis ca. 2×10^6 /ml (83 Vol.-% negativ), bei der 1 1/2-fachen Standardabweichung von ca. 10^4 bis ca. 10^7 /ml (80 Vol.-%), von ca. 10^4 bis ca. 6×10^6 /ml (83 Vol.-% positiv) bzw. von ca. 10^4 bis

ca. 6×10^6 /ml (83 Vol.-% negativ) und bei Einbeziehung der zweifachen Standardabweichung von ca. 4×10^3 bis ca. 5×10^7 /ml (80 Vol.-%), von ca. 4×10^3 bis ca. 2×10^7 /ml (83 Vol.-% positiv) bzw. von ca. 4×10^3 bis ca. 2×10^7 /ml (83 Vol.-% negativ). Die entsprechenden Angaben für die "doppelte Alkoholprobe" (GKZ) wie auch für die anderen Kriterien (EKZ, Psychrotrophe, Coliforme, Pyruvat- bzw. L(+)-Laktatgehalt) lassen sich den Abbildungen 8 bis 13 entnehmen.

Da Mittelwerte, Standardabweichungen und Extremwerte bei den geprüften Alkoholkonzentrationen keine endgültige Aussage zulassen, ob die Alkoholprobe als Schnellverfahren zur Feststellung der hygienischen Beschaffenheit von Rohmilch geeignet ist, wurde außerdem ermittelt, wie hoch der Anteil der Milchproben in verschiedenen Keimgehaltsbereichen sowie Pyruvat- bzw. L(+)-Laktatgehaltsbereichen war, der erstmals durch eine der geprüften Alkoholkonzentrationen erfaßt wurde. Die Einteilung in die verschiedenen Bereiche erfolgte zum Teil in Anlehnung an in gesetzlichen Vorschriften genannte oder zur Diskussion gestellte Grenzwerte, zum Teil nach eigenem Ermessen.

Von den 267 Milchproben mit weniger als 250.000 Keimen/ml (GKZ) wurden 23 (8,6 %) bereits von 77 Vol.-%igem Alkohol zur Gerinnung gebracht, 69 (25,8 %) von 80 Vol.-%igem Alkohol und 126 (47,2 %) von 83 Vol.-%igem Alkohol (jeweils einfache Alkoholmenge); mit 52,8 % (141 Proben) erwiesen sich mehr als die Hälfte der Milchproben als stabil gegenüber der höchsten geprüften Alkoholkonzentration (Tab. 14). Bei den Proben mit 250.000 bis 500.000 Keimen/ml

Tab. 14: Ausfall der Alkoholprobe in verschiedenen Keimzahlbereichen (GKZ)

Keimzahlbereich in 10 ³ /ml	Anzahl (%) der Proben bei Alkoholkonzentration in Vol.-%				total
	77 positiv	80 positiv	83 positiv	83 negativ	
< 250	23 (8,6)	69 (25,8)	126 (47,2)	141 (52,8)	267
250 - 500	7 (13,2)	18 (34,0)	30 (56,6)	23 (43,4)	53
> 500 - 1.000	8 (9,4)	32 (37,6)	49 (57,6)	36 (42,4)	85
> 1.000	49 (24,8)	90 (45,5)	119 (60,1)	79 (39,9)	198
< 250	"einfache Alkoholprobe"				
	49 (18,4)	117 (43,8)	210 (78,7)	57 (21,3)	267
	15 (28,3)	28 (52,8)	48 (90,6)	5 (9,4)	53
	26 (30,6)	47 (55,3)	75 (88,2)	10 (11,8)	85
> 1.000	75 (37,9)	107 (54,0)	185 (93,4)	13 (6,6)	198
	"doppelte Alkoholprobe"				

war einerseits der Anteil der gegen 77 Vol.-%igem Alkohol ("einfache Alkoholprobe") empfindlichen Milchproben mit 13,2 % etwas größer, andererseits war der Anteil der auch bei Zusatz von 83 Vol.-%igem Alkohol nicht präzipitierten Milchproben mit 43,4 % etwas geringer als bei den keimärmeren Proben. Bei den Milchproben mit mehr als 500.000 bis 1.000.000 Keimen/ml wurden hinsichtlich des Verhaltens gegenüber 83 Vol.-%igem Alkohol ähnliche Verhältnisse registriert wie beim zuvor aufgeführten Keimzahlbereich. Von den 198 Milchproben mit mehr als 10^6 Keimen/ml reagierten etwa 25 % positiv bei 77 Vol.-%igem Alkohol und ca. 45 % bei 80 Vol.-%igem Alkohol; ca. 40 % der Proben waren bei Zugabe des 83 Vol.-%igen Alkohols nicht ausgeflockt. Bei der "doppelten Alkoholprobe" waren nur etwas mehr als 20 % der Milchproben mit weniger als 250.000 Keimen/ml stabil gegenüber der zuletzt erwähnten Alkoholkonzentration. Andererseits waren ca. 45 % der Milchproben des letztgenannten Keimzahlbereiches mit 80 Vol.-%igem Alkohol positiv, bei den Proben mit mindestens 250.000 Keimen/ml sogar über 50 %.

Bei der EKZ (Tab. 15) wurde ca. ein Drittel (34,4 %) aller 128 Proben mit weniger als 250.000 Keimen durch den 80 Vol.-%igen Alkohol zur Gerinnung gebracht ("einfache Alkoholprobe"). Ca. 40 % der Proben dieses Keimzahlbereichs waren gegenüber 83 Vol.-%igem Alkohol nicht empfindlich. Auch bei den Milchproben der anderen drei Keimzahlbereiche waren zwar solche Alkohol-stabilen Proben zu finden, doch reagierten jeweils mehr als die Hälfte der Proben dieser Bereiche bereits bei 80 Vol.-%igem Alkohol positiv. Bei der Probe mit doppeltem Alkoholvolumen be-

Tab. 15: Ausfall der Alkoholprobe in verschiedenen Keimzahlbereichen (EKZ)

Keimzahlbereich in 10 ³ /ml	Anzahl (%) der Proben bei Alkoholkonzentration in Vol.-%				total
	77 positiv	80 positiv	83 positiv	83 negativ	
< 250	18 (14,1)	44 (34,4)	78 (61,0)	50 (39,0)	128
250 - 500	5 (55,6)	7 (77,8)	0	2 (22,2)	9
> 500 - 1.000	4 (57,1)	0	5 (71,4)	2 (28,6)	7
> 1.000	2 (40,0)	4 (80,0)	0	1 (20,0)	5
			"einfache Alkoholprobe"		
250	34 (26,6)	69 (53,9)	109 (85,2)	19 (14,8)	128
< 250 - 500	5 (55,6)	7 (77,8)	8 (88,9)	1 (11,1)	9
> 500 - 1.000	4 (57,1)	5 (71,4)	7 (100,0)	0	7
> 1.000	3 (60,0)	4 (80,0)	0	1 (20,0)	5
			"doppelte Alkoholprobe"		

standen insbesondere insofern erhebliche Unterschiede zwischen den vier Keimzahlbereichen, als von den Milchproben mit weniger als 250.000 Keimen/ml nur etwa 25 % durch 77 Vol.-%igen Alkohol zum Ausflocken gebracht wurden, von den Proben der anderen Keimzahlbereiche aber jeweils über 50 %. Der Prozentsatz der bei Zusatz von 83 Vol.-%igem Alkohol stabilen Proben reichte von 0 (mehr als 500.000 bis 1.000.000 Keime/ml) bis 20 (mehr als 1.000.000 Keime/ml).

Die bei den Psychrotrophen (Tab. 16) registrierten Ergebnisse ("einfache" bzw. "doppelte Alkoholprobe") zeigten Parallelen zur GKZ. Die prozentuale Aufteilung der Proben mit weniger als 10.000 Psychrotrophen/ml entsprach in etwa jener der Proben mit weniger als 250.000 Keimen/ml (GKZ), jene mit 10.000 bis 100.000 Psychrotrophen/ml der mit 250.000 bis 500.000 Keimen/ml und jene mit mehr als 100.000 Psychrotrophen/ml jener mit mehr als 1.000.000 Keimen/ml.

Auch bei den Coliformen (Tab. 17) waren gewisse Ähnlichkeiten mit der Verteilung bei der GKZ gegeben. Ungefähr vergleichbar waren die prozentualen Probenanteile in folgenden Keimgehaltsbereichen (Coliforme zuerst genannt): weniger als 10 /ml und weniger als 250.000 /ml (GKZ), 10 bis 100 bzw. mehr als 100 bis 1.000 /ml und 250.000 bis 500.000 /ml (GKZ), mehr als 1.000 bis 10.000 /ml und mehr als 500.000 bis 1.000.000 /ml (GKZ), mehr als 10.000 /ml und mehr als 1.000.000 /ml (GKZ). So waren z.B. jeweils etwas mehr als 50 % (20 %) der Proben, die weniger als 10 Coliforme/ml bzw. weniger

Tab. 16: Ausfall der Alkoholprobe in verschiedenen Keimzahlbereichen (Psychrotrophe)

Keimzahlbereich in 10^3 /ml	Anzahl (%) der Proben bei Alkoholkonzentration in Vol.-%				
	77 positiv	80 positiv	83 positiv	83 negativ	total
<10	16 (7,3)	56 (25,5)	93 (42,3)	127 (57,7)	220
10 - 100	33 (14,0)	79 (33,5)	129 (54,7)	107 (45,3)	236
>100	38 (25,9)	72 (49,0)	97 (66,0)	50 (34,0)	147
			"einfache Alkoholprobe"		
< 10	40 (18,2)	94 (42,7)	177 (80,5)	43 (19,5)	220
10 - 100	60 (25,4)	116 (49,2)	207 (87,7)	29 (12,3)	236
>100	65 (44,2)	90 (61,2)	134 (91,1)	13 (8,9)	147
			"doppelte Alkoholprobe"		

Tab. 17: Ausfall der Alkoholprobe in verschiedenen Keimzahlbereichen (Coliforme)

Keimzahlbereich in 10^1 /ml	Anzahl (%) der Proben bei Alkoholkonzentration in Vol.-%				total
	77 positiv	80 positiv	83 positiv	83 negativ	
< 1			"einfache Alkoholprobe"		
	7 (9,2)	22 (28,9)	35 (46,0)	41 (54,0)	76
1 - 10	19 (14,2)	50 (37,3)	74 (55,2)	60 (44,8)	134
> 10 - 100	21 (15,3)	41 (29,9)	73 (53,3)	64 (46,7)	137
> 100 - 1.000	7 (6,8)	27 (26,2)	49 (47,6)	54 (52,4)	103
> 1.000	34 (22,2)	65 (42,5)	85 (55,6)	68 (44,4)	153
			"doppelte Alkoholprobe"		
< 1	18 (23,7)	35 (46,1)	59 (77,7)	17 (22,3)	76
1 - 10	40 (29,8)	70 (52,2)	115 (85,8)	19 (14,2)	134
> 10 - 100	31 (22,6)	66 (48,2)	122 (89,0)	15 (11,0)	137
> 100 - 1.000	22 (21,4)	48 (46,6)	84 (81,6)	19 (18,4)	103
> 1.000	53 (34,6)	76 (49,7)	137 (89,5)	16 (10,5)	153

Tab. 18: Ausfall der Alkoholprobe in verschiedenen Pyruvatgehaltsbereichen

Pyruvatgehalt in ppm	Anzahl (%) der Proben bei Alkoholkonzentration in Vol.-%				total
	77 positiv	80 positiv	83 positiv	83 negativ	
bis 1,0					
	3 (4,4)	16 (23,5)	31 (45,6)	37 (54,4)	68
> 1,0 - 2,0	18 (28,6)	29 (46,0)	48 (76,2)	15 (23,8)	63
> 2,0	8 (44,4)	14 (77,8)	15 (83,3)	3 (16,7)	18
			"einfache Alkoholprobe"		
bis 1,0	10 (14,7)	29 (42,6)	50 (73,5)	18 (26,5)	68
> 1,0 - 2,0	23 (36,5)	42 (66,7)	60 (95,2)	3 (4,8)	63
> 2,0	13 (72,2)	14 (77,8)	18 (100,0)	0	18
			"doppelte Alkoholprobe"		

Tab. 19: Ausfall der Alkoholprobe in verschiedenen L(+)-Laktatgehaltsbereichen

Laktatgehalt in ppm	Anzahl (%) der Proben bei Alkoholkonzentration in Vol.-%				total
	77 positiv	80 positiv	83 positiv	83 negativ	
bis 20	10 (13,0)	24 (31,2)	42 (54,6)	35 (45,4)	77
> 20 - 30	3 (14,3)	7 (33,3)	15 (71,4)	6 (28,6)	21
> 30 - 50	5 (25,0)	13 (65,0)	15 (75,0)	5 (25,0)	20
> 50	11 (44,0)	15 (60,0)	21 (84,0)	4 (16,0)	25
bis 20	20 (26,0)	42 (54,5)	65 (84,4)	12 (15,6)	77
> 20 - 30	5 (23,8)	11 (52,4)	19 (90,5)	2 (9,5)	21
> 30 - 50	8 (40,0)	13 (65,0)	19 (95,0)	1 (5,0)	20
> 50	13 (52,0)	17 (68,0)	24 (96,0)	1 (4,0)	25

als 250.000 Keime/ml (GKZ) aufwiesen, gegenüber der "einfachen ("doppelten") Alkoholprobe" mit 83 Vol.-%igem Alkohol stabil.

Beim Pyruvatgehalt (Tab. 18) bzw. L(+)-Laktatgehalt (Tab. 19) waren etwas andere Verhältnisse als bei den bisher besprochenen Parametern gegeben. Zwar waren auch die Anteile der Milchproben mit weniger als 1 ppm Pyruvat bei den verschiedenen Alkoholkonzentrationen mit den Prozentsätzen der Milchproben mit weniger als 250.000 Keime/ml (GKZ) vergleichbar, doch ergaben sich für die beiden anderen Pyruvatgehaltsbereiche (mehr als 1 bis 2 ppm bzw. mehr als 2 ppm) keine Parallelen zur GKZ. Von den Milchproben mit mehr als 1 bis 2 ppm Pyruvat waren z.B. nur ca. 25 % ("einfache Alkoholprobe") bzw. 5 % ("doppelte Alkoholprobe") gegen 83 Vol.-%igen Alkohol stabil, während bereits mehr als 45 % bzw. fast 70 % schon bei Zusatz von 80 Vol.-%igem Alkohol Gerinnung zeigten. Von den Proben mit mehr als 2 ppm Pyruvat waren ca. 80 % gegenüber der letztgenannten Alkoholkonzentration empfindlich. Beim L(+)-Laktat (Milchproben mit bis zu 20 ppm) waren einerseits nur etwas mehr als 45 % ("einfache Alkoholprobe") bzw. 15 % ("doppelte Alkoholprobe") gegen 83 Vol.-%igen Alkohol nicht empfindlich, obwohl andererseits auch nur 13 % bzw. 26 % durch 77 Vol.-%igen Alkohol zum Ausflocken gebracht wurden. Von den Milchproben mit mehr als 20 bis 30 ppm reagierten in erster Linie erheblich mehr beim 83 Vol.-%igen Alkohol, während der Anteil der bei 77 Vol.-% bzw. 80 Vol.-% positiven Proben nahezu unverändert blieb. Von den Proben mit mehr als 30 ppm L(+)-Laktat gerannen schon mindestens 60 % mit 80 Vol.-%igem Alkohol ("einfache" und "doppelte Alkoholprobe").

4. DISKUSSION

In den meisten Ländern der Bundesrepublik Deutschland werden für die Beurteilung der bakteriologischen Beschaffenheit der Anlieferungsmilch immer noch die Reduktionsproben mit Methylenblau oder Resazurin eingesetzt, obwohl bereits seit längerer Zeit bekannt ist, daß eine hygienische Bewertung und Bezahlung der Milch aufgrund des Ausfalls der Reduktionsproben nicht ideal ist und häufig zu ungerechten Beurteilungen führt (KOLLEGIUM DER BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG, 1969). Infolgedessen sind - trotz der unbestritten leichten Handhabung und schnellen Beurteilungsmöglichkeit der Reduktionsproben - Untersuchungsverfahren erforderlich, die eine objektive Aussage, insbesondere bei gekühlter Milch, erlauben. Diesen Anforderungen entsprechen zwar kulturelle Keimgehaltsbestimmungsverfahren - in den Niederlanden wird z.B. ungekühlte Kannenmilch mit der Reduktionsprobe, gekühlte Tankmilch mit dem Koch'schen Plattenverfahren untersucht (POSTHUMUS, KLIJN und GIESEN, 1974) -, doch stehen der Anwendung derartiger Verfahren in der konventionellen Form der hohe Material- und Zeitaufwand entgegen. Es hat daher nicht an Versuchen gefehlt, diese Nachteile weitestgehend auszuschalten, und zwar durch Modifikationen des Verfahrens selbst oder durch Verwendung von automatischen Dosier- und Verdünnungsgeräten, Geräten zur automatischen Abfüllung von Nährmedium sowie Computer-Bild-Analysatoren für die Auswertung etc. Von den Modifikationen des Koch'schen Plattenverfahrens kommt dem Platten-Ösen-Verfahren (THOMPSON, DONNELLY und BLACK, 1960; TATINI, DABBAH und OLSON, 1967; THOMPSON und BLACK, 1967; WRIGHT et al., 1970; BRADSHAW, FRANCIS und READ, 1971; LIMMER und WÖBBECKE, 1972; LIMMER, 1973a und b; SPILLMANN 1973; POSTHUMUS, KLIJN und GIESEN, 1974) die größte Bedeu-

tung zu. Diese Methode erlaubt nach allgemeiner Ansicht ein rationelles und schnelles Arbeiten und ermöglicht, Keimzahlen von einigen Tausend bis etwa 200.000 /ml in einem Arbeitsgang zu bestimmen, ohne daß ein hoher Aufwand an Material oder Geräten erforderlich ist. Allerdings stimmen die auf diese Weise ermittelten Keimzahlen bei höheren Keimgehalten, insbesondere aber ab 500.000 /ml (LIMMER, 1973a und b) weniger gut mit jenen des Koch'schen Plattenverfahrens überein, da es zu einer immer stärkeren gegenseitigen Wachstumsbeeinflussung der Keime kommt. Die teilweise oder vollständige Mechanisierung bzw. Automatisierung der Keimzahlbestimmung nach Art des Koch'schen Plattenverfahrens wurde bisher vorwiegend in orientierenden Versuchen von wissenschaftlichen Institutionen erprobt. Es ist aufgrund der dabei erzielten Ergebnisse nicht auszuschließen, daß derartige Rationalisierungsmaßnahmen bei weiterer Perfektionierung dazu führen können, daß das Koch'sche Plattenverfahren als Routineverfahren für Massenuntersuchungen in Zentrallaboratorien zur Anwendung kommen kann. Von der Überlegung ausgehend, daß die Messung bakterieller Stoffwechselprodukte eine umfassendere Information über abgelaufene mikrobielle Abbauvorgänge in der Rohmilch und deren Wertigkeit vermitteln kann als die Keimzahlbestimmung, wurden in den letzten Jahren die Parameter Pyruvat- und Laktatgehalt - ermittelt in der kontinuierlichen Durchflußanalyse - als Beurteilungsgrundlagen für den bakteriologischen Status der Anlieferungsmilch zur Diskussion gestellt (TOLLE et al., 1971 und 1972). Nach TOLLE (1973) und HEESCHEN et al. (1975) ist davon auszugehen, daß der auf bakterielle Aktivität zurückzuführende Anstieg des Pyruvat-

gehaltenes über den Basiswert von 0,5 ppm bei einer Keimzahl von ca. $50 - 100 \times 10^3$ Keimen/ml Milch einsetzt. Für den Laktatgehalt sind derartige Nachweisgrenzen nicht bekannt. Nach dem bisherigen Stand der Untersuchungen ist es jedoch noch nicht möglich, Grenzwerte für den Pyruvat- bzw. Laktatgehalt festzulegen. Die Schwierigkeiten für die Definition von Grenzwerten bei Pyruvat lassen sich auf die Tatsache zurückführen, daß eine längere Lagerung tiefgekühlter Rohmilch im Erzeugerbereich eine Zunahme des Pyruvatgehaltes bei gleichbleibender Keimzahl bewirkt und noch nicht bekannt ist, wie diese höheren Pyruvatwerte bei zweitägiger Milchstapelung zu bewerten sind (STAHLHUT-KLIPP und KRONENBERGER, 1975; WIESNER, 1975).

Aufgrund dieser augenblicklich wenig zufriedenstellenden Situation lag es nahe zu prüfen, ob es nicht doch ein einfaches und schnell durchführbares, für Massenuntersuchungen geeignetes, objektives Verfahren gibt, das zur Ermittlung der hygienischen Qualität von Rohmilch herangezogen werden kann. Es stellte sich bei diesen Überlegungen u.a. die Frage, ob nicht die Feststellung der Alkoholstabilität den erwähnten Anforderungen gerecht werden könne. Zwar ist die klassische Alkoholprobe mit 68 Vol.-%igem Alkohol (MARTINY, 1891), die ursprünglich nur für die Ermittlung von Rohmilch mit kurzer Haltbarkeit (= Kochfähigkeit) vorgesehen war (MORRES, 1905, 1911) und auch noch Mitte der 60er Jahre in den Güteverordnungen einiger Bundesländer zur Bestimmung des Frischezustandes der Anlieferungsmilch vorgeschrieben war (SOLTERBECK, 1966), für diesen Zweck aufgrund zu geringer Empfindlichkeit nicht geeignet, doch gilt dieses nicht unbedingt für die Bestimmung der Alkoholstabilität

der Rohmilch mit höher konzentriertem Alkohol (= verschärfte Alkoholprobe). Es wurde daher über einen längeren Zeitraum in einem kleinen oberbayerischen Molkerei-Einzugsgebiet bei 603 Anlieferungsmilchproben von 25 Erzeugern eine verschärfte Alkoholprobe mit 77, 80 bzw. 83 Vol.-%igem Alkohol - jeweils sowohl mit gleichen Raumteilen Alkohol und Milch ("einfache Alkoholprobe") als auch mit doppelten Volumina Alkohol ("doppelte Alkoholprobe") durchgeführt. (Diese Alkoholkonzentrationen wurden aufgrund der bei Vorversuchen erzielten Ergebnisse und in Anlehnung an die Angaben anderer Autoren (HIGGINBOTTOM, 1948; HUGHES und ELLISON, 1949; JONES und THOMAS, 1955; HEINTZBERGER, 1958) gewählt.) Parallel dazu wurden verschiedene mikrobiologische Parameter (Gesamtkeimzahl, Psychrotrophe, Coliforme) bestimmt, in einigen orientierenden Versuchen wurden auch die elektronische Mikrokoloniezählung sowie die Bestimmung von Pyruvat- bzw. L(+)-Laktatgehalt durchgeführt.

Bei der "einfachen Alkoholprobe" reagierten 14,4 % (77 Vol.-%iger Alkohol), 34,7 % (80 Vol.-%) bzw. 53,7 % (83 Vol.-%) der 603 Anlieferungsmilchproben positiv. Sofern die Untersuchungen mit der doppelten Alkoholmenge vorgenommen wurden, lagen die Prozentsätze bei den erwähnten Alkoholkonzentrationen bei 27,4 %, 49,6 % bzw. 85,9 %. Während HIGGINBOTTOM (1948) vergleichbare Resultate erzielte, lagen die von anderen Autoren (HUGHES und ELLISON, 1949; JONES-EVANS, 1949; JONES und THOMAS, 1955) genannten Werte zum Teil erheblich darüber (Tab. 20). Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Zum einen können die Unterschiede dadurch bedingt sein, daß die Proben zu verschiedenen Jahreszeiten genommen wurden. Aus den eigenen Ergebnissen läßt sich nämlich ableiten, daß erheb-

Tab. 20: Literaturangaben zur Häufigkeit alkoholempfindlicher Anlieferungsmilchproben bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen (gleiche Raumteile Alkohol und Milch)

Autor	Anzahl der Proben	davon positiv (%)	Alkoholkonzentration %
HUGHES und ELLISON (1949)	338	27,0	72
JONES-EVANS (1949)	889	27,1	72
HIGGINBOTTOM (1948)	1.285	12,0	75
HUGHES und ELLISON (1949)	378	33,1	76
JONES und THOMAS (1955)	304	63,2	76
HIGGINBOTTOM (1948)	1.285	34,0	80
JONES und THOMAS (1955)	304	78,0	80

liche jahreszeitliche Differenzen bestehen: Im Winter und Frühjahr (Januar mit Juni) waren bei jeder der drei geprüften Alkoholkonzentrationen erheblich mehr Proben positiv (Tab. 3 und 4) als in den restlichen Monaten. (Bei der "doppelten Alkoholprobe" traf dies für den 83 Vol.-%igen Alkohol nicht derartig ausgeprägt zu.) Zum anderen ist die Verschiedenartigkeit des Probenmaterials zu berücksichtigen, die vermutlich eine wesentlichere Rolle spielt als die möglicherweise jahreszeitlich unterschiedliche Probenahme. Da die in Tab. 20 aufgeführten Autoren anstelle einer Keimgehaltsbestimmung nur Reduktionsproben durchführten, auf die bei den eigenen Versuchen aufgrund ihrer geringen Aussagekraft wiederum verzichtet wurde, ist es nicht möglich zu entscheiden, inwieweit Differenzen in der bakteriologischen Beschaffenheit

entscheidend für die Unterschiede bei der Prüfung der Alkoholstabilität waren. Die eigenen Versuche haben jedoch gezeigt, daß Zusammenhänge zwischen Keimgehalt und Alkoholstabilität gegeben sind; nach DU TOIT, LÜCK und VAN TONDER (1970) belief sich der Korrelationskoeffizient auf $r = - 0,42$. Schließlich ist auch daran zu denken, daß die Zufütterung von Calcium einen Einfluß auf das Verhalten der Milch gegenüber Alkohol haben kann (AUZINGER, 1909 und 1914; SOMMER und BINNEY, 1923; SEEKLES und SMEETS, 1947) und in manchen Gegenden die Böden besonders kalkhaltig sind (SCARLETT und BLOMFIELD, 1946).

Vor der Gegenüberstellung der Ergebnisse der Alkoholproben und jener der anderen geprüften Parameter soll kurz auf letztere eingegangen werden.

Das geometrische Mittel der im Koch'schen Plattenverfahren bestimmten Gesamtkeimzahl (GKZ) der 603 Anlieferungsmilchproben betrug 334×10^3 /ml. Jeweils mehr als 45 % dieser Proben wiesen weniger als 250×10^3 bzw. mehr als 500×10^3 Keime/ml auf. Aufgrund der starken Streuung der Ergebnisse (Extremwerte: 1×10^3 /ml und 50×10^6 /ml) ließen sich die jahreszeitlichen Unterschiede der Mittelwerte statistisch nicht absichern. Bei der elektronischen Mikrokoloniezählung (EKZ), die nur bei 149 der 603 Proben mitlief, wurden durchwegs erheblich niedrigere Keimzahlen registriert, so daß sich ein Mittelwert von nur 62×10^3 /ml ergab. Etwas mehr als 85 % dieser Proben unterschritten dabei den Grenzwert von 250×10^3 /ml, der in Schleswig-Holstein entsprechend dem Vorschlag von KIND (1972) und in Hamburg aufgrund der Güteverordnung das Maximum für Anlieferungsmilch der Güteklasse I ist. Für die Psychrotrophen wurde ein Mittelwert

von 22×10^3 /ml errechnet, für die Coliformen ein solcher von 720 /ml. In etwas mehr als einem Viertel der Proben wurden mehr als 1.000 Coliforme/ml gefunden, so daß diese Proben - einer Beurteilung von WIESNER (1975) folgend - einen mangelhaften Hygienestatus aufwiesen. Die bei den Psychrotrophen bzw. Coliformen ermittelten jahreszeitlichen Differenzen der Mittelwerte ließen sich im Gegensatz zu jenen der EKZ auch statistisch absichern. Die für die beiden Stoffwechselparameter Pyruvat und L(+)-Laktat ermittelten arithmetischen Mittelwerte lagen - wie Vergleiche mit den Angaben in der Arbeit von KOHLER (1974) zeigen - mit 1,3 ppm bzw. 31 ppm relativ niedrig. Dies ist darauf zurückzuführen, daß in ca. 50 % der Proben weniger als 1 ppm Pyruvat bzw. weniger als 20 ppm L(+)-Laktat nachgewiesen werden konnten.

Aus den summarisch zusammengefaßten Ergebnissen der bakteriologischen bzw. biochemischen Parameter geht hervor, daß die getesteten Milchproben im Durchschnitt weder von extrem guter noch von extrem schlechter Qualität waren. Somit sind bei dem vorliegenden Untersuchungsmaterial die erforderlichen Voraussetzungen für eine allgemeingültige Aussage zum Wert einer verschärften Alkoholprobe als Verfahren zur Ermittlung der hygienischen Qualität von Anlieferungsmilch gegeben. Für einen Vergleich eignet sich insbesondere die GKZ, die am ehesten von den geprüften Parametern zur Bestimmung der mikrobiologischen Qualität von Rohmilch geeignet ist (ZAADHOF und TERPLAN, 1971). Aus diesem Grunde wurden zuerst die Mittelwerte der Milchproben berechnet, die bei Zusatz 77 Vol.-%igen, 80 Vol.-%igen oder 83 Vol.-%igen Alkohols ausgeflockt waren. Diese Mittelwerte lauteten

bei Verwendung gleicher Mengen Alkohols und Milch:
 995×10^3 /ml, 360×10^3 /ml bzw. 269×10^3 /ml; die gegen-
über 83 Vol.-%igen Alkohol stabilen Milchproben wiesen
durchschnittlich 250×10^3 Keime/ml auf. Aufgrund der
großen Streuung der Einzelergebnisse (siehe auch Abb. 8)
ließ sich jedoch nur der Mittelwert bei der Alkoholprobe
mit 77 Vol.-%igem Alkohol von jedem der anderen drei GKZ-
Mittelwerte mit Sicherheit abgrenzen. Da infolgedessen
mit den drei gewählten Alkoholkonzentrationen nur eine
Einteilung in zwei Güteklassen (Milch mit hohem Keimge-
halt bzw. Milch mit mittlerem Keimgehalt) möglich wäre,
könnte auf eine Alkoholkonzentration (80 Vol.-% oder
83 Vol.-%) verzichtet werden. Für eine dritte Güteklasse
wäre dann eine neue Alkoholkonzentration zu wählen, und
zwar je nach Zielsetzung entweder zwischen 77 und 80 Vol.-%
(für Milchproben zwischen ca. 500×10^3 und ca. 1.000×10^3
Keimen/ml) oder über 83 Vol.-% (für Milchproben mit ge-
ringerem GKZ-Mittelwert als er für die Alkoholprobe mit
83 Vol.-%igem Alkohol registriert wurde).

Die für die verschiedenen Alkoholkonzentrationen ermittel-
ten Durchschnittswerte erlauben selbst bei deutlicher Ab-
grenzung allein noch keine Aussage, ob die Alkoholreaktion
ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der bakteriologi-
schen Beschaffenheit der Rohmilch ist. Dazu ist nämlich
außerdem erforderlich, daß die Mehrzahl der Proben eines
Keimgehaltsbereiches auch tatsächlich erfaßt wird und nur
vereinzelt Ausreißer zu beobachten sind. Dies war jedoch
bei der verschärften "einfachen Alkoholprobe" bei den ge-
prüften Alkoholkonzentrationen nicht der Fall. So waren
noch ca. 40 % der Proben mit mehr als 10^6 Keimen/ml stabil

gegenüber 83 Vol.-%igem Alkohol, obwohl der geometrische Mittelwert bei dieser Alkoholprobe bei 250×10^3 Keimen/ml lag. Bei der Durchführung der Alkoholprobe mit der doppelten Menge Alkohol wurden bei der Ermittlung der Mittelwerte der drei Alkoholkonzentrationen zum Teil paradoxe Ergebnisse registriert. Zwar fiel das geometrische Mittel zuerst von 698×10^3 Keimen/ml (77 Vol.-%iger Alkohol) auf 209×10^3 /ml (80 Vol.-%iger Alkohol), doch stieg es dann überraschenderweise wieder auf 414×10^3 Keimen/ml (83 Vol.-%iger Alkohol). Diese Zunahme war dadurch bedingt, daß in den Monaten August bis Dezember sehr viele Proben mit mehr als 10^6 Keimen/ml vorhanden waren, die erst bei Zusatz der doppelten Menge 83 Vol.-%igen Alkohols positiv reagierten. Für die gegen 83 Vol.-%igen Alkohol stabilen Proben wurde erwartungsgemäß der niedrigste Mittelwert (95×10^3 /ml) errechnet. Da sich die Mittelwerte der verschiedenen Alkoholkonzentrationen signifikant unterschieden, wäre eine Einteilung der Proben entsprechend dem Ausfall der Alkoholprobe in drei Klassen möglich: Proben, die empfindlich gegen 77 Vol.-% Alkohol reagieren - Proben, die durch 80 Vol.-%igen Alkohol ausgefällt werden - Proben, die gegen 83 Vol.-%igen Alkohol stabil sind. Gegen die Einführung der "doppelten Alkoholprobe" in der beschriebenen Form sprechen jedoch wiederum die Alkoholreaktionen in verschiedenen Keimzahlbereichen. So waren z.B. zwar nur etwas mehr als 5 % der Proben mit 10^6 Keimen/ml stabil gegenüber dem 83 Vol.-%igen Alkohol, doch wurden andererseits nahezu 40 % der Proben mit 10^6 Keimen/ml erst bei dieser Alkoholkonzentration ausgefällt, obwohl die Probe durchschnittlich bei 95×10^3 Keimen/ml positiv war. Bei den anderen getesteten Parametern lagen ähnliche Verhältnisse wie bei der GKZ

vor. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Autoren überein, die ebenfalls keine engen Beziehungen zwischen Alkoholreaktion und Keimgehalt (KOOPER, 1914; AYERS und JOHNSON, 1915; DU TOIT, LÜCK und VAN TONDER, 1970) bzw. zwischen Alkoholreaktion und Reduktionsprobe (HIGGIN-BOTTOM, 1948; HUGHES und ELLISON, 1949; JONES-EVANS, 1949; JONES und THOMAS, 1955) ermitteln konnten. Das KOLLEGIUM DER BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG (1969) vertrat ebenfalls die Ansicht, daß Alkoholproben keine genügend scharfe Differenzierung in bezug auf den Keimgehalt ermöglichen. Inwieweit die von CHALMERS (1928) sowie DU TOIT, LÜCK und VAN TONDER (1970) empfohlene Prä-Inkubation der Milchproben geeignet ist, die mikrobiologische Beschaffenheit der Milch aufgrund der Alkoholreaktion besser als bisher abzuschätzen, ist nicht bekannt. Falls sich diese Angaben jedoch bestätigen lassen sollten, wäre erneut zu überprüfen, ob die einfach und schnell durchzuführenden und einfach abzulesenden Alkoholproben nicht doch zur Qualitätsbeurteilung von Rohmilch eingesetzt werden können. Ideal wäre es dann, wenn dabei die Alkoholkonzentrationen stufenlos (77, 78, 79, etc.) vergleichend eingesetzt würden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Zeitraum von März 1974 bis Mai 1975 wurden 603 Anlieferungsmilchproben 25 verschiedener Erzeuger auf ihre Stabilität gegenüber 77, 80 bzw. 83 Vol.-%igem Alkohol geprüft, und zwar bei Verwendung gleicher Raumteile Alkohol und Milch bzw. doppelter Raumteile Alkohol. Außerdem wurden vergleichsweise die Gesamtkeimzahl im Koch'schen Plattenverfahren (GKZ) sowie die Anzahl Psychrotropher und Coliformer ermittelt. In orientierenden Untersuchungen wurde an 149 Proben zusätzlich die elektronische Mikrokoloniezählung (EKZ) sowie die Bestimmung von Pyruvat- und L(+)-Laktatgehalt in der kontinuierlichen Durchflußanalyse durchgeführt.

Die Alkoholprobe mit 77 Vol.-%igem Alkohol fiel in der "einfachen Probe" bei 87 (14,4 %) bzw. in der "doppelten Probe" bei 165 (27,4 %) Milchproben positiv aus; die vergleichbaren Werte für den 80 Vol.-%igen Alkohol lauteten 34,7 % und 49,6 %, jene für den 83 Vol.-%igen Alkohol 53,7 % und 85,9 %. Der Ausfall der Alkoholreaktion war starken jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen. Als Mittelwerte für die mikrobiologischen und biochemischen Parameter wurden registriert: 334×10^3 /ml (GKZ); 62×10^3 /ml (EKZ); 22×10^3 /ml (Psychrotrophe); 720 /ml (Coliforme); 1,3 ppm (Pyruvat); 31 ppm (L(+)-Laktat). Die jahreszeitlichen Schwankungen der Werte waren teilweise erheblich geringer als bei der Alkoholreaktion.

2. Im zweiten Versuchsabschnitt wurden die Mittelwerte der oben genannten Parameter rechnerisch bestimmt, bei denen die Probe mit einfachen bzw. doppelten Mengen 77, 80 bzw. 83 Vol.-%igen Alkohols positiv ausgefallen war. Für die GKZ wurden bei steigender Alkoholkonzentration folgende Werte (in 10^3 /ml) registriert: 995 - 360 - 269 ("einfache Probe") bzw. 698 - 209 - 414 ("doppelte Probe"). Die Mittelwerte für die gegen Zusatz 83 Vol.-%igen Alkohols stabilen Milchproben lauteten 250×10^3 /ml bei der einfachen Alkoholmenge und 95×10^3 /ml bei der doppelten Alkoholmenge. Bei der einfachen Alkoholmenge unterschied sich nur der Mittelwert für 77 Vol.-%igen Alkohol signifikant von den anderen Mittelwerten, während bei der doppelten Alkoholmenge zwar die Mittelwerte statistisch gesichert voneinander abwichen, der Mittelwert für den 83 Vol.-%igen Alkohol aber paradoxerweise deutlich höher lag als jener für 80 Vol.-%igen Alkohol. Bei den anderen mikrobiologischen und biochemischen Parametern waren ähnliche Verhältnisse gegeben.
3. Trotz vergleichbarer GKZ waren die Alkoholreaktionen häufig uneinheitlich. Entsprechendes galt auch für die anderen Parameter.
4. Die Alkoholstabilität der Milch scheint kein geeignetes Kriterium für die Bestimmung der hygienischen Qualität von Anlieferungsmilch zu sein.

5. Das von TERPLAN (1965) empfohlene Stempelverfahren erbrachte eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die bei der Ermittlung coliformer Keime im Standard-Routineverfahren des INTERNATIONALEN MILCHWIRTSCHAFTSVERBANDES erzielt wurden.

S U M M A R Y

1. From March 1974 to May 1975 a total of 603 samples of 25 different milk producers were tested for their stability to 77, 80 and 83 v/v of ethanol, with equal quantities of ethanol and milk or two volumes of ethanol and one volume milk. Besides the standard plate count was done and the number of psychrotrophic and coliforme bacteria was determined. In additional tests 149 of these 603 samples were tested for their microcolony counts and contents of pyruvate and l(+)-lactic acid.

87 (14.4 %) and 165 (27.4 %) of the tested samples reacted positive with 77 v/v of alcohol (equal volumes of alcohol and milk and two volumes of alcohol respectively); the correspondent results with 80 v/v of ethanol were 34.7 % and 49.6 % respectively, those with 83 v/v ethanol 53.7 % and 85.9 %. The results of the alcohol reaction depended on seasonal changes. The mean values for the microbiological and biochemical parameters were: 334×10^3 /ml (total count); 62×10^3 /ml (microcolony count); 22×10^3 /ml (psychrotrophic count); 720 /ml (coliforme count); 1.3 ppm (pyruvate) and 31 ppm (l(+)-lactic acid). The seasonal differences were mostly considerably lower than those of the alcohol reaction.

2. In the second part of the investigations the results of the alcohol-test (77, 80 and 83 v/v respectively) were correlated with the corresponding means of the foresaid

parameters. With increasing concentrations of ethanol the geometric means of the total count came to $995 - 360 - 269 \times 10^3$ /ml (equal volumes of alcohol and milk) an $698 - 205 - 414 \times 10^3$ /ml (two volumes of ethanol). Samples stable to 83 v/v had 250×10^3 microorganisms/ml and 95×10^3 microorganisms/ml respectively. Only the results of the positive alcohol-test with equal volumes of 77 v/v ethanol and milk differed significantly from the results of the other alcohol-concentrations. In the positiv alcohol-test with two volumes of ethanol all the means differed significantly, but the mean of the tests with 83 v/v was higher than that with 80 v/v ethanol. Similiar observations were made with the other microbiological and biochemical parameters.

3. In spite of similar total counts of the milk samples, the results of the alcohol reactions often were non-uniform. Analogous differences were found with the other parameters.
4. Alcohol-stability doesn't seem to be a suitable parameter for the determination of the hygienical quality of raw milk.
5. The method described by TERPLAN (1965) showed a good agreement with the standard routine-method (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION) for determination of coliforme bacteria.

6. LITERATURVERZEICHNIS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1972):

Standard methods for the examination of dairy products.

Amer.Public Hlth.Assoc., 13. Auflage, S. 102-104.

ANDERSON, E.B. und G.S. WILSON (1945):

The resazurin and methylene-blue tests as a measure of the keeping quality of milk.

J.Dairy Res. 14, 21-27.

ASSENOWA, K. (1949):

Eine Mikro-Alkoholprobe zur Prüfung der Annahmemilch.

Milchwiss. 4, 245-246.

AUZINGER, A. (1909):

Studien über die Alkoholprobe der Milch, ihre Verwendbarkeit zum Nachweis abnormer Milchen und ihre Beziehungen zu anderen Prüfungsmethoden pathologischer Milch.

Milchwirtsch.Zbl. 5, 293-315, 352-370, 393-413, 430-446.

Derselbe (1914):

Die Alkoholreaktion der Milch.

Molk.-Ztg. Hildesheim, 28, 457-459.

AYERS, S.H. und W.T. JOHNSON, jr. (1915):

The alcohol test in relation to milk.

Bull.U.S.Dep.Agric. no. 202.

zit. nach SOMMER, H.H. und T.H. BINNEY (1923).

BÄRKWORTH, -. (1943):

Dairy Ind. 8, 201.

zit. nach HUGHES A.E. und D. ELLISON (1949).

BLAU, G. (1960):

Zur Keimzahlbestimmung der Anlieferungsmilch.

Milchwiss. 15, 178-183.

BRADSHAW, J.G., D.W. FRANCIS und R.B. READ, jr. (1971):

Automation of pour-plate preparation.

J.Dairy Sci. 54, 755.

BREED, R.S. (1911):

The determination of the number of bacteria in milk by direct microscopical examination.

Cbl.Bakt., II. Abt. 30, 337-340.

CAMPBELL, J.E. und J.E. GILCHRIST (1973):

Spiral plating technique for counting bacteria in milk and other foods.

Develop.Ind.Microbiol. 14, 95-102.

CHALMERS, C.H. (1928):

A modification of the alcohol test as an index of the bacterial count and keeping quality of milk.

J.Bact. 15, 93-104.

CLEGG, L.F.L. (1952):

Rejection tests for raw milk:

A review of the literature.

Dairy Sci.Abstr. 14, 731-750.

DEMETER, K.J. (1967):

Bakteriologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft.

4. Auflage, Verlag E. Ulmer, Stuttgart.

DEVARDA, A. (1914):

Welchen Wert hat die Alizarolprobe für die Untersuchung der Milch zum Zwecke der Marktkontrolle?

Milchwirtsch. Zbl. 43, 154-158.

ERNST, W. (1913):

Grundriss der Milchhygiene für Tierärzte.

8. Auflage, Verlag F. Enke, Stuttgart, S. 274.

EUGLING, W. (1885):

Studien über das Casein in der Kuhmilch und über die Labfermentwirkung.

Die landwirtschaftl. Versuchsstationen, 31, 391-405.

FENDLER, G. und C. BORKEL (1911):

Alkoholprobe und Säuregrad der Milch.

Zschr.Unters. Nahr- und Genußmittel 21, 477-480.

FLEISCHMANN, W. (1901):

Lehrbuch der Milchwirtschaft.

3. Auflage, Verlag Heinsius, Leipzig, S. 119-120.

FOLDA, W. (1973):

Die direkte Keimzahlbestimmung nach BREED.

Dtsch.Milchwirtschaft 24, Beilage Lebensmittellabor 1/73, S.IX

FUNG, D.Y.C. und A.A. KRAFT (1968):

Microtiter method for the evaluation of viable cells in bacterial cultures.

Appl.Microbiol. 16, 1036-1039.

GERICK, K. (1972):

Zur Methode der Mikrokoloniezählung in Rohmilch.

Milchwirtsch.Berichte, Wolfpassing und Rotholz, Folge 32, 239-240.

GILCHRIST, J.E., J.E. CAMPBELL, C.B. DONNELLY, J.T. PEELER und J.M. DELANEY (1973):

Spiral plate method for bacterial determination.

Appl.Microbiol. 25, 244-252.

GLASER, D.A. und W.H. WATTENBURG (1966):

An automated system for the growth and analysis of large numbers of bacterial colonies using an environmental chamber and a computer-controlled flying-spot scanner.

Ann.N.Y. Acad.Sci. 139, 243-257.

GODBERSEN, G.W. (1972):

Neue Nachweismethodik zur Feststellung der absoluten Gesamtkeimzahl in der Milch.

Dtsch.Milchwirtschaft 23, 1301.

Derselbe (1973a):

Die Instant-Keimzählmethode.

Dtsch.Milchwirtschaft 24, Beilage Lebensmittellabor 1/73, S. VI-VII.

Derselbe (1973b):

Die Instant-Keimzählmethode.

Zweiter Bericht über eine mikroskopische Keimzählmethode zur Feststellung der absoluten Keimzahl in Milch, Rahm und anderen flüssigen bzw. homogen flüssig zu machenden Medien.

Dtsch.Milchwirtschaft 24, 146-148.

Derselbe (1973c):

Instant-Keimzählmethode.

Dtsch.Molk.-Ztg. 94, 528-530.

GROSSE-BOHLE, H. (1907):

Die hygienische Überwachung des Verkehrs mit Milch.

Zschr.Unters. Nahr- und Genußmittel 14, 78-89.

GUNSTHEIM, R. (1971):

Untersuchungen zur Eignung der elektronischen Mikrokoloniezählung für die Keimzahlbestimmung von Milch.

Vet.med.Diss. Hannover.

HEESCHEN, W., J. REICHMUTH, A. TOLLE und H. ZEIDLER (1969):

Die Konservierung von Milchproben zur bakteriologischen, zytologischen und hemmstoffbiologischen Untersuchung.

Milchwiss. 24, 729-734.

HEESCHEN, W., A. TOLLE, G. SUHREN und J. REICHMUTH (1975):

Entwicklung einer automatisierten Analytik zur Messung der bakteriologischen Wertigkeit der Milch.

Berichte über Landwirtschaft. Biologisch-technische Fortschritte in der Milchproduktion und Proteingewinnung.

190. Sonderheft, Verlag P. Parey, Hamburg, Berlin, S. 179-188.

HEINTZBERGER, H.C. (1958):

Classificatie van melk naar het melkzuurgehalte.

Neth.Milk Dairy J. 12, 38-49.

HENKEL, Th. (1907):

Die Acidität der Milch, deren Beziehungen zur Gerinnung beim Kochen und mit Alkohol, die Säurebestimmungsmethoden, der Verlauf der Säuerung.

Milchwirtsch.Zbl. 3, 340-369, 378-405.

Derselbe (1920):

Katechismus der Milchwirtschaft.

4. Auflage, Verlag E. Ulmer, Stuttgart, S. 57-60.

HIGGINBOTTOM, C. (1948):

Platform rejection tests in south-west Scotland.

Dairy Ind. 13, 1187-1196.

HOEFT, H. (1898):

Molk.-Ztg. Berlin, no. 17

zit. nach HENKEL, Th. (1907).

HÖYBERG, H.M. (1911):

Mitteilungen aus der praktischen Milchkontrolle.

Zschr.Fleisch- und Milchhyg. 21, 392-396.

HUGHES, A.E. und D. ELLISON (1949):

Preliminary observations on the application of an alcohol screening test, used in conjunction with the ten-minute resazurin test, for detecting unsatisfactory milk on arrival at creameries.

J.Soc.Dairy Techn. 2, 149-151.

IIZUKA, M. (1960):

Studies on alcohol test positive milk with normal acidity.

I. Field survey on alcohol tested positive milk of dairy cows.
Jap.J.Vet.Sci. 22, 369-380.

Derselbe (1961):

Studies on normal-acidity alcohol-test positive milk.

I. Field survey on secretion of alcohol-test positive milk.
Bull.Nat.Inst.Anim.Hlth. 41, 81-96.

IIZUKA, M., M. KUBOMICHI, K. SUGIURA, S. SHOYA, S. KIRISAWA
und N. YOSHIDA (1961a):

Studies on alcohol test positive milk with normal acidity.

II. Experimental study on the occurrence of alcohol tested
positive milk due to liver dysfunction.

Jap.J.Vet.Sci. 23, 13-25.

Dieselben (1961b):

Studies on normal-acidity, alcohol-test positive milk.

II. Experiments on occurrence of alcohol-test positive milk
by liver dysfunction.

Bull.Nat.Inst.Anim.Hlth. 41, 97-113.

IIZUKA, M., K. SUGIURA, M. KUBOMICHI und N. YOSHIDA (1961c):

Studies on alcohol test positive milk with normal acidity.

III. Study on the mechanism of the occurrence of alcohol test
positive milk caused by liver dysfunction.

Jap.J.Vet.Sci. 23, 193-206.

Dieselben (1961d):

Studies on normal-acidity, alcohol test positive milk.

III. A study on the mechanism of secretion of alcohol-test
positive milk due to liver dysfunction.

Bull.Nat.Inst.Anim.Hlth. 42, 1-17

INGELS, N.B., G.T. DAUGHTERS und A. BURZIO (1968):
New design for an automated bacterial colony counter.
The Review of Scientific Instruments 39, 115-120.

INTERNATIONALER MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND (1958):
Bestimmung des Keimgehaltes von flüssiger und getrockneter
Milch. Standard 3.
Milchwiss. 1961, 16, 650-652.

Derselbe (1966):
Standard-Routinemethode für Zählung coliformer Bakterien in
Rohmilch. Standard 39.
Milchwiss. 1968, 23, 297-298.

JEUNET, R., R. GRAPPIN, M.H. THIOILLIERE und M. RICHARD (1973):
First tests with an automatic apparatus for counting colonies
on petri dishes. Application to the enumeration of "total
bacteria" in milk.
Revue Laitière Française no. 312, 647, 649, 651, 653, 655.
Ref.: Dairy Sci.Abstr. 1974, 36, 598.

JOHST, F. (1971):
Großversuche zur Einsatzmöglichkeit elektronischer Teilchenzähl-
geräte bei der Qualitätsbestimmung der Rohmilch.
Mhefte Vet.Med. 26, 85-91.

JONES, G.E. und S.B. THOMAS (1955):
A comparison of some milk rejection tests.
J.appl.Bact. 18, 225-231.

JONES-EVANS E. (1949):
Screening and rejection tests in relation to the keeping
quality of milk.
J.Soc.Dairy Techn. 2, 232-236.

KIND, H. (1972):

Beurteilung der Rohmilchqualität durch elektronische Mikrokoloniezählung.

Dtsch.Molk.-Ztg. 93, 1714-1726.

KIND, H., H. BILLMAYER und E.-H. UBBEN (1975):

Elektronische Mikrokoloniezählung in der praktischen Anwendung.

Dtsch.Molk.-Ztg. 96, 1140-1146.

KOHLER, J. (1974):

Erhebungen über den Pyruvat- sowie L(+)- und D(-)-Laktatgehalt in Trockenmilchprodukten.

Vet.med.Diss. München.

KOLLEGIUM DER BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG KIEL (1969):

Die hygienische Wertigkeit der Rohmilch und Empfehlung zu ihrer weiteren Verbesserung.

Kieler Milchw.Forsch.Ber. 21, 201-356.

KOOPER, W.D. (1914):

Die Titration der Milch mit Alkohol verschiedener Konzentration.

Molk.-Ztg. Hildesheim, 28, 715-716.

KUNDRAT, W. (1966):

Psychrophile Bakterien in Milch und Milchprodukten.

Arch.Lebensmittelhyg. 17, 160-162.

KYNAST, S. (1973a):

Neue Schnellmethode zur Keimzahlbestimmung.

Die Molk.-Ztg. Welt der Milch 27, 1284.

Derselbe (1973b):

Über eine neue Schnellmethode zur direkten Keimzahlbestimmung in Milch.

Dtsch.Molk.-Ztg. 94, 2004-2005.

LABUSCHAGNE, J.H. (1968):

The stability of the caseinate complex in milk.

I. The relationship between alcohol stability and the mineral composition.

Dairy Ind.J.sth.Afr. 8, 155, 157, 159, 161, 163.

Ref.: Dairy Sci.Abstr. 1970, 32, 319.

LIMMER, H.-D. (1973a):

Keimzahlbestimmungen nach dem Ösen-Plattenverfahren.

Dtsch.Milchwirtschaft 24, 1982-1986.

Derselbe (1973b):

Die Keimzahlermittlung in Rohmilch mittels eines modifizierten Ösen-Plattenverfahrens.

Dtsch.Molk.-Ztg. 94, 1400-1402.

LIMMER, H.-D. und R. WOEBBECKE (1972):

Qualitätsprüfung der Anlieferungsmilch nach einer modifizierten Ösen-Plattenmethode.

Dtsch.Milchwirtschaft 23, 1027-1031.

LÖHNIS, F. (1914):

Die Titration der Milch mit Alkohol von verschiedener Konzentration.

Molk.-Ztg. Hildesheim, 28, 153-155.

MACKENZIE, E. (1973):

Thermoduric and psychrotrophic organisms on poorly cleansed milking plants and farm bulk milk tanks.

J.appl.Bact. 36, 457-463.

MALLIGO, J.E. (1965):

Evaluation of an automatic electronic device for counting bacterial colonies.

Appl.Microbiol. 13, 931-934.

MANSBERG, H.P. (1957):

Automatic particle and bacterial colony counter.

Science 126, 823-827.

MARTENS, A.E. und R.R.A. MORTON (1975):

Zur Automatisierung visueller Methoden in der Mikrobiologie.

Arch.Lebensmittelhyg. 26, 9.

MARTINY, B. (1891):

Dtsch. (Berliner) MolK.-Ztg. S. 166.

zit. nach HENKEL, Th. (1907).

MATTICK, A.T.R., A. ROWLANDS, H. BARKWORTH, Z. HOSKING und O. KEMPTHORNE (1950):

Keeping quality and raw-milk grading.

J.Dairy Res. 17, 159-191.

MERTA, E. (1953):

Methodik zur Qualitätsbeurteilung der Milch.

Agr.Diss. München (TU).

METHODENBUCH (Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik) (1970):

Chemische, physikalische und bakteriologische Untersuchungsverfahren für Milch, Milcherzeugnisse und Molkereihilfsstoffe.
3. Auflage, Verlag Neumann, S. 27.

MITAMURA, K. (1937):

J.Fac.Agric., Sapporo 41, 97.

zit. nach HUGHES, A.E. und D. ELLISON (1949).

MORRES, W. (1905):

Untersuchungen über eine einfache und zuverlässige Methode zur Haltbarkeitsprüfung der Milch.

Milch-Ztg. 34, 573-575, 585-586.

Derselbe (1909):

Zur Alkoholprobe der Milch.

Molk.-Ztg. Hildesheim, 23, 1319-1321.

Derselbe (1911):

Die Haltbarkeitsprüfung der Milch.

Zschr.Unters. Nahr- und Genußmittel 22, 459-464.

Derselbe (1914):

Alkoholprobe und Alizarolprobe.

Milchwirtsch.Zbl. 43, 208-211.

MOSSSEL, D.A.A. und A. VAN DE MOOSDIJK (1964):

The practical significance in the microbiological examination of cold stored foods of the allegedly low heat resistance among psychrotrophic organisms.

J.appl.Bact. 27, 221-223.

N.N. (1975):

Automatisierte Keimzahlbestimmung der Milch.

Die Molk.-Ztg. Welt der Milch 29, 1091-1092.

PACKARD, V.S.jr. und R.E. GINN (1974):

A statistical evaluation of the 3M Brand Automatic Colony Counter.

J.Milk Fd.Techn. 37, 435-437.

PAUL, S. und B. NITSCH (1972):

Vergleich der elektronischen Mikrokoloniezählung mit anderen Beurteilungsmethoden für Rohmilch am Beispiel milchwirtschaftlich wichtiger Keimarten.

Milchwirtsch.Berichte, Wolfpassing und Rotholz, Folge 32, 237-238.

Dieselben (1974):

Die Anwendung der elektronischen Mikrokoloniezählung (EMZ) zur Qualitätskontrolle von Rohmilch.

Dtsch.Molk.-Ztg. 95, 1164-1170, 1201-1205.

POSTHUMUS, G., C.J. KLIJN und Th.J.J. GIESEN (1974):

A mechanized loop method for total count of bacteria in refrigerated suppliers'milk.

Neth.Milk Dairy J. 28, 79-92.

PURI, B.R., K. MURARI und K.K. TOTEJA (1965):

Studies in stability of protein dispersion in milk.

I. Ethanol stability.

Indian J.Dairy Sci. 18, 112-114.

READ, R.B.jr., J.E. GILCHRIST, C.B. DONNELLY und
J.E. CAMPBELL (1975):

Das Spiralverfahren zum Ausstreichen und zur Zählung von
Bakterien.

Arch.Lebensmittelhyg. 26, 8-9.

REISS, F. (1904):

Wie muß der Alkohol zur Prüfung der Milch auf Kochfähigkeit
beschaffen sein?

Molk.-Ztg. Hildesheim, 18, 831-832.

Derselbe (1906):

Über eine schnellere und billigere Ausführung der Alkohol-
probe in den Milchhandlungen.

Molk.-Ztg. Hildesheim, 20, 50-51.

ROEDER, G. (1952):

Studien über Veränderungen der Milch nach dem Melken.

Milchwiss. 7, 334-342.

Derselbe (1954):

Grundzüge der Milchwirtschaft und des Molkereiwesens.

Verlag P. Parey, Hamburg, Berlin, S. 739-748.

SCARLETT, -. und -. BLOMFIELD (1946):

zit. nach HUGHES, A.E. und D. ELLISON (1949).

SCHÄFER, B. (1966):

Zur Eignung von Oberflächen-Tupfer-Kulturen für die Be-
stimmung des Keimgehalts von Milch.

Vet.med.Diss. Hannover.

SCHLEUSSNER, R. (1973):

Einfluß des Keimgehalts der Rohmilch unter Berücksichtigung des Zellgehalts auf die Qualität von pasteurisierter Trinkmilch und Milchprodukten.

Vet.med.Diss. München.

SCORTESCO, G. und A. CACIULARU (1962):

Contribution à l'étude de la qualité microbiologique du lait appréciée par l'épreuve de la réductase.

16. Internationaler Milchwirtschaftskongress, Bd.C., S. 410-413.

SEEKLES, L. und W.T.G.M. SMEETS (1947):

Instability of milk due to an increased activity of calcium ions.

Neth.Milk Dairy J. 1, 7-18.

Ref.: Dairy Sci.Abstr. 1947, 9, 243.

SHARPE, A.N., D.R. BIGGS und R.J. OLIVER (1972):

Machine for automatic bacteriological pour plate preparation.

Appl.Microbiol. 24, 70-76.

SHARPE, A.N. und G.L. MICHAUD (1975):

Ein neuer Aspekt zur automatisierten Zählung von Bakterienkolonien.

Arch.Lebensmittelhyg. 26, 10-11.

SHIGA, K., T. KOISHIKAWA, M. YOSHINO, G. CHIKUMA,
N. YANO und R. TORII (1964):

Studies on the availability of alcohol-test-positive fresh
milk for dairy manufacturing.

I. The relationship between the ethanol-stability and the
properties of fresh milk.

Bull.Nat.Inst.Anim.Ind.Chiba 7, S. 21-28.

Ref.: Dairy Sci.Abstr. 1965, 27, 512.

SIEMERS, H. (1968):

Untersuchung zur Eignung von Nährkarton und Nährkarton-
systemen zur Keimzahlbestimmung in der Milch.

Vet.med.Diss. Hannover.

SOLTERBECK, H.-W. (1966):

Die Situation und die Erfordernisse bei der Gütebewertung
der Anlieferungsmilch.

Molk.- und Käserei-Ztg. 17, 1194-1196.

SOMMER, H.H. und T.H. BINNEY (1923):

A study of the factors that influence the coagulation of
milk in the alcohol test.

J.Dairy Sci. 6, 176-197.

SPELLMANN, H. (1973):

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl nach dem Ösen-Plattenver-
fahren für die Qualitätsbezahlung der "Lieferanten-Milch"
in der Schweiz.

Dtsch.Molk.-Ztg. 94, 1404-1405.

STAHLHUT-KLIPP, -. und -. KRONENBERGER (1975):

Die Eignung der Pyruvatbestimmung zur Beurteilung der hygienischen Wertigkeit der Milch.

Dtsch.Milchwirtschaft 26, S. 470-471.

SUHREN, G. (1975):

Computer-Bildanalyse und elektronische Mikrokoloniezählung zum Nachweis von Mikroorganismen in Milch.

Arch.Lebensmittelhyg. 26, 10.

SUHREN, G., W. HEESCHEN und A. TOLLE (1975):

Zur Messung des Verderbnisrisikos von Milch.

Milchwiss. 30, 473-475.

TATINI, S.R., R. DABBAH und J.C. OLSON, jr. (1967):

Comparison of plate loop and agar plate methods for bacteriological examination of manufacturing grade raw milk.

J.Milk Fd.Techn. 30, 112-115.

TERPLAN, G. (1965):

Intensivierung der Kühltechnik in der Milcherzeugung - andere Methoden zur Gütebeurteilung?

Dtsch.Molk.-Ztg. 86, 1741-1742.

THOMAS, M.-J. (1970):

Zur Bestimmung des Milchkeimgehalts nach dem MPN-Prinzip.

Vet.med.Diss. Hannover.

THOMAS, S.B. und G.M. PHILLIPS (1942):

The ten minute resazurin test.

Abstr.Proc.Soc.Agric.Bact. 5, 22-24.

zit. nach HUGHES, A.E. und D. ELLISON (1949).

THOMPSON, D.J. und L.A. BLACK (1967):

The use of the 0,01 ml loop in the plate loop method
for making viable counts of milk.

J.Milk Fd.Techn. 30, 273-276.

THOMPSON, D.J., C.B. DONNELLY und L.A. BLACK (1960):

A plate loop method for determining viable counts of
raw milk.

J.Milk Fd.Techn. 23, 167-171.

TILLMANS, J. und W. OBERMEIER (1920):

Über die Wasserstoffionenkonzentration der Milch.

Zschr.Unters. Nahr- und Genußmittel 40, 23-34.

TOIT, J.J. DU, H. LÜCK und J.L. VAN TONDER (1970):

The relationship between the bacterial content of milk
and its alcohol stability.

S.Afr.J.Dairy Techn. 2, 193-199.

TOLLE, A., W. HEESCHEN, J. REICHMUTH und H. KIND (1971):

Trinkmilch in der Bundesrepublik Deutschland:

Ihr bakteriologischer, biochemischer und rückstandsanaly-
tischer Status.

Milchwiss. 26, 401-410.

TOLLE, A., W. HEESCHEN, J. REICHMUTH und H. WERNERY (1972):

Möglichkeiten zur Automatisierung von Keimzählungen.

Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A. 220, 162-173.

TOLLE, A., W. HEESCHEN, H. WERNERY, J. REICHMUTH und
G. SUHREN (1972):

Die Pyruvatbestimmung -

ein neuer Weg zur Messung der mikrobiologischen Wertigkeit
der Milch.

Milchwiss. 27, 343-351.

TOLLE, A., H. ZEIDLER und W. HEESCHEN (1966):

Zur Beurteilung der hygienischen Qualität der Anlieferungs-
milch mit Hilfe neuer Methoden.

Milchwiss. 21, 757-763.

Dieselben (1968):

Die elektronische Mikrokoloniezählung -

ein Verfahren zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen
Qualität der Rohmilch.

Milchwiss. 23, 65-70.

TOLLE, A., H. ZEIDLER, W. HEESCHEN, J. KRAACK und
J. REICHMUTH (1968):

Untersuchungen über somatische Zellen, saprophytäre Keime
und antibiotisch wirksame Hemmstoffe in der Rohmilch aus
12 Einzugsgebieten der BRD.

Kieler Milchw.Forsch.Ber. 20, S. 343-394.

WEIMAR, A.C. (1923):

The alcohol test as a means of detecting abnormal milk.

J.Dairy Sci. 6, 95-101.

WERNERY, H. (1972):

Zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit von Milch durch die quantitative Bestimmung von Pyruvat und die Computer-Bild-Analyse von Plattenkulturen.

Vet.med.Diss. Berlin.

WERNERY, H., J. REICHMUTH, W. HEESCHEN und A. TOLLE (1973):

Automatisierung der Keimzählung von Plattenkulturen mit Hilfe des Computer-Bild-Analysators.

Dtsch.Molk.-Ztg. 94, 524-527.

WIESNER, H.-U. (1975):

Zur Aussagekraft des Pyruvatgehaltes in Rohmilch beim Erzeuger.

Milchwiss. 30, 471-473.

WRIGHT, E.O., G.W. REINBOLD, L. BURMEISTER und

J. MELLON (1970):

Prediction of standard plate count of manufacturing-grade raw milk from the plate loop count.

J.Milk Fd.Techn. 33, 168-170.

ZAADHOF, K.-J. und G. TERPLAN (1971):

Zur Eignung einiger Methoden für die Ermittlung der mikrobiologischen Qualität von Rohmilch.

Arch.Lebensmittelhyg. 22, 129-131.

Dieselben (1973):

Keimgehaltsbestimmung in der Rohmilch.

Dtsch.Milchwirtschaft 24, Beilage Lebensmittellabor 1/73,

S. III-V.

Abschließend möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Ausführung meiner Arbeit meinen Dank aussprechen.

Besonders danke ich Herrn Dr. K.-J. Zaadhof für seine wertvollen Anregungen und seine Hilfsbereitschaft bei den Untersuchungen und bei der Durchsicht meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich recht herzlich bedanken bei Herrn Dipl.-Math. Dr. K. Osterkorn für die Beratung bei den biomathematischen Verrechnungen.

Für die stets gern gewährte Hilfeleistung bin ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls dankbar.

LEBENS LAUF

Am 15. Juni 1946 wurde ich als ältestes Kind der Eheleute Franz Jordans und Paula, geb. Sonderfeld in Marienbaum geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit in Marienbaum, von Ostern 1952 bis Ostern 1956, wechselte ich zur Städt. Zubringerschule nach Kalkar, Ostern 1960 zum Progymnasium nach Xanten und im Jahre 1964 zum Neusprachlichen Gymnasium in Goch, wo ich am 2. November 1966 meine Reifeprüfung ablegte. Anfang 1967 wurde ich zum Bundeswehrdienst einberufen.

Zum Sommersemester 1968 begann ich mein Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, wo ich im März 1973 mit dem Staatsexamen mein Studium abschloß. Am 23. Juli 1973 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

